



# **Universidad de Oviedo**

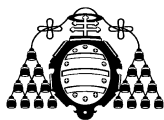
**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

**Trabajo Fin de Máster**

## **Desarrollo de prototipo de sensor luminiscente para la detección de tóxicos ambientales**

**Sara Caño Domínguez**

**Julio 2016, Oviedo**



**José Manuel Costa Fernández** Profesor del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo.

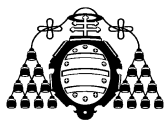
CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado “**Desarrollo de prototipo de sensor luminiscente para la detección de tóxicos ambientales**”

ha sido realizado por la alumna **Sara Caño Domínguez** bajo mi co-dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2015-16, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 11 de Julio de 2016

Fdo.: José Manuel Costa Fernández



UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
Centro Internacional de Postgrado  
Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas

**Francisco Javier Ferrero Martín** Profesor del Departamento de Ingeniería Eléctrica, Electrónica, de Computadores y Sistemas de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado “**Desarrollo de prototipo de sensor luminiscente para la detección de tóxicos ambientales**”

ha sido realizado por la alumna **Sara Caño Domínguez** bajo mi co-dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2015-16, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 11 de Julio de 2016

Fdo.: Francisco Javier Ferrero Martín

Finalizado este corto pero intenso periodo de mi vida, quiero mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han estado a mi lado, pero sobre todo, a aquellas que sin estarlo, han sabido apoyarme en todo momento.

A mis padres, que me dieron alas para volar, y gracias a ellos estoy labrando un buen futuro.

A Jael, que me dio la confianza y fuerza que más necesité en los momentos de flaqueza.

A Marta, por darme una importante base en el mundo de los Quantum Dots, sin la cual este Trabajo no hubiera sido posible.

A Mario, que siempre estuvo atento para ayudarme en todo lo que pudo cuando me vio sola.

A Francisco Javier Ferrero, que siempre escuchó mis hipótesis con atención y me adentró en el mundo de la electrónica.

A Juan Manuel Costa que, a pesar de ser el hombre más ocupado del mundo, consiguió guiarme hasta el final.

A mis "Vecinitos", por hacer de este año el más increíble de mi vida.

A todos, gracias.

## Índice

ÍNDICE DE FIGURAS .....	III
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....	V
A. <i>INTRODUCCIÓN</i> .....	1
A.1. LA ACETONA: UN TÓXICO AMBIENTAL .....	2
A.2. QUANTUM DOTS .....	3
A.2.1. Definición y propiedades .....	3
A.2.2. Composición .....	5
A.2.3. Síntesis .....	7
A.2.4. Solubilización en medios acuosos .....	8
A.2.5. Inmovilización .....	9
A.2.6. QDs dopados.....	10
A.2.6.1. Propiedades luminiscentes de los QDs dopados con $Mn^{2+}$ .....	12
A.2.6.2. Aplicaciones analíticas de los QDs de Mn:ZnS .....	14
B. <i>OBJETIVO</i> .....	16
C. <i>EXPERIMENTAL</i> .....	19
C.1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS.....	20
C.1.1. Instrumentación .....	20
C.1.2. Material.....	21
C.1.3. Reactivos y disoluciones.....	21
C.2. SÍNTESIS DE QDs FOSFORESCENTES .....	22
C.3. CARACTERIZACIÓN.....	23
C.3.1. Tamaño y forma.....	24
C.3.2. Características fotoluminiscentes.....	25
C.3.2.1. Efecto de la fotoactivación.....	27
C.3.2.2. Estabilidad a largo plazo .....	29

C.3.2.3. Efecto de acetona disuelta.....	30
C.4. DESARROLLO DE UN SENSOR LUMINISCENTE PARA LA DETECCIÓN DE ACETONA EN ATMÓSFERAS CONTAMINADAS .....	32
C.4.1. Procedimiento de síntesis de una matriz sol-gel para la inmovilización de Mn:ZnS QDs .....	32
C.4.2. Caracterización de Mn:ZnS QDs inmovilizados en matrices sol-gel .....	33
C.4.3. Efecto de acetona .....	35
C.5. IMPLEMENTACIÓN DEL SENSOR EN UN PROTOTIPO INSTRUMENTAL .....	38
C.5.1. Diseño del prototipo instrumental.....	38
C.5.2. Detección de acetona .....	41
C.5.3. Detección de otro tipo de especies tóxicas: cloroformo .....	44
D. CONCLUSIONES .....	46
E. BIBLIOGRAFÍA .....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de niveles de energía típicos en función del número de átomos que constituyen el nanocrystal. A medida que aumenta el número de átomos, los niveles discretos de los orbitales atómicos se convierten en bandas de energía (semiconductor convencional) (7).....	4
<b>Figura 2.</b> Espectros de absorción (A) y emisión (B) de QDs de diferentes tamaños compuestos de un núcleo de CdSe y recubrimiento de ZnS (8).....	4
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de la alineación de los niveles de energía de los sistemas núcleo/recubrimiento. Los bordes superiores e inferiores de las formas externas se corresponden con las bandas de conducción y valencia del recubrimiento respectivamente, y los superiores e inferiores de las formas internas se corresponden con las bandas de conducción y valencia del núcleo respectivamente (6).....	6
<b>Figura 4.</b> A) Estructura de la L-cisteína. B) Comportamiento de los grupos funcionales de la cisteína en función del pH.....	8
<b>Figura 5.</b> Vía de introducción de dopantes antes de que se produzca la formación del núcleo (esquema superior) y vía de introducción de dopantes durante la formación del recubrimiento del QD (esquema inferior). ....	11
<b>Figura 6.</b> Proceso de emisión luminiscente de QDs dopados con $Mn^{2+}$ . ....	13
<b>Figura 7.</b> Proceso de síntesis Mn:ZnS QDs.....	23
<b>Figura 8.</b> Imagen TEM de una solución de Mn:ZnS QDs en buffer PBS.....	24
<b>Figura 9.</b> Espectros de excitación y emisión fosforescente de una disolución de Mn:ZnS QDs.....	26
<b>Figura 10.</b> Espectros de excitación y emisión fluorescente de una disolución de Mn:ZnS QDs.....	26
<b>Figura 11.</b> Curva de desactivación de la emisión fosforescente de una disolución de Mn:ZnS QDs. ....	27
<b>Figura 12.</b> Estudio de la fotoestabilidad de los Mn:ZnS QDs.....	28
<b>Figura 13.</b> Evaluación de la estabilidad de Mn:ZnS QDs a largo plazo.....	29
<b>Figura 14.</b> Efecto de la adición de acetona (de $1.3 \text{ gL}^{-1}$ a $15.5 \text{ gL}^{-1}$ ) en la emisión fosforescente de Mn:ZnS QDs. ....	31
<b>Figura 15.</b> Representación de Stern-Volmer para el efecto de la adición de acetona (de $1.3 \text{ gL}^{-1}$ a $15.5 \text{ gL}^{-1}$ ) en la emisión fosforescente de Mn:ZnS QDs.....	32
<b>Figura 16.</b> Montaje experimental utilizado para todas las mediciones. ....	34

<b>Figura 17.</b> Comparación del espectro de emisión de Mn:ZnS QDs en disolución (línea verde) e incorporados a matriz sol-gel (línea roja).....	34
<b>Figura 18.</b> Respuesta fosforescente de la fase sensora ante inyecciones de igual concentración de acetona.....	36
<b>Figura 19.</b> Representación de Stern-Volmer para el efecto de la adición de $0.788 \text{ gL}^{-1}$ de acetona en la emisión fosforescente de Mn:ZnS QDs. ....	37
<b>Figura 20.</b> Disposición de prototipo instrumental dentro del banco de ensayos. ....	38
<b>Figura 21.</b> Esquema de prototipo instrumental. ....	39
<b>Figura 22.</b> Características del PMT H7827-001, sensibilidad del ánodo (izquierda) y ganancia del PMT (derecha).....	40
<b>Figura 23.</b> Respuesta fosforescente de la fase sensora ante inyecciones de igual concentración de acetona.....	41
<b>Figura 24.</b> Representación de Stern-Volmer para el efecto de la adición de $0.946 \text{ gL}^{-1}$ de acetona en la emisión fosforescente de Mn:ZnS QDs. ....	42
<b>Figura 25.</b> Respuesta fosforescente de la fase sensora ante inyecciones de igual concentración de acetona.....	43
<b>Figura 26.</b> Respuesta fosforescente de la fase sensora ante inyecciones de igual volumen inicial de acetona y cloroformo ( $600 \mu\text{L}$ ). ....	45



## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

---

APTES	(3-aminopropil) trietoxisilano
DLS	Dispersión de luz dinámica
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidroclicorada
FRET	Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer
IDEPA	Instituto de Desarrollo Económico del Principado de Asturias
INSHT	Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo
LED	Light Emitting diode
MPS	Mercaptopropil(trimetoxi)silano
PBS	Buffer de fosfatos
PMT	Fotomultiplicador
SNR	Relación señal-ruído
QDs	Quantum Dots
TEM	Microscopía de Transmisión Electrónica
TMOS	Tetrametoxisilano
UV	Ultravioleta

## ***A. INTRODUCCIÓN***

## **A.1. LA ACETONA: UN TÓXICO AMBIENTAL**

La acetona o propanona es un compuesto de fórmula química  $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$  del grupo de las cetonas que se encuentra naturalmente en el medio ambiente. A temperatura ambiente se presenta como un líquido incoloro de olor característico. Se evapora fácilmente, es inflamable y soluble en agua.

Es un disolvente extensamente utilizado en procesos industriales tales como la fabricación de plásticos, fibras, medicamentos o zapatos. Las aguas residuales, lixiviación industrial o las emisiones procedentes de los tubos de escape de automóviles y turbinas, hacen posible la existencia de acetona en el medio ambiente. Este compuesto se encuentra también presente de manera natural en plantas, árboles o como producto de incendios forestales, pero los procesos industriales son los que proporcionan concentraciones mayores de esta cetona (1).

Se conoce que la acetona produce efectos adversos en el organismo humano debido a su toxicidad. Una exposición a acetona supone el paso a la sangre y, por ende, su propagación por todo el organismo. Una inhalación importante de acetona o incluso su ingesta, genera irritación de las mucosas, ojos y alteraciones en los pulmones, cursando con mareos, dolores de cabeza y vómitos, entre otros síntomas (2).

Por todo lo anterior, es interesante la determinación de acetona en aguas de consumo, así como en aguas superficiales (cuya presencia es debida a procesos microbianos) y en los propios fluidos humanos, siendo indicadora de diversas enfermedades como cetonuria, cuando se encuentra presente en orina, o cetoacidosis diabética, cuando se encuentra en sangre (3). Por otra parte, también resulta de interés la determinación de acetona en atmósferas contaminadas. Los niveles de acetona en el aire son generalmente bajos. Sin embargo, las personas que trabajan industrias que procesan y usan acetona, pueden estar expuestas a niveles más altos que la población general. Estas industrias incluyen ciertas fábricas de pinturas, plásticos, fibras artificiales y zapatos. Los trabajadores y las personas expuestas a cantidades elevadas de acetona en el ambiente de trabajo (niveles de 100 ppm de acetona en el aire) pueden sufrir irritación del sistema respiratorio y los ojos. Trabajadores expuestos a niveles superiores pueden sufrir de dolor de cabeza, vértigo, mareo, inestabilidad y confusión dependiendo del tiempo de exposición. Por ello, disponer de sistemas de alarma que midan los niveles de acetona en atmósferas

contaminadas, e informen de que los niveles son superiores a los recomendables, resulta de alto interés para evitar problemas de contaminación ocupacional (2).

En los últimos años, se han desarrollado metodologías de bioanálisis basadas en la nanotecnología, que permiten detectar este disolvente reemplazando los fluoróforos convencionales por nanomateriales luminiscentes, como son los puntos cuánticos o Quantum Dots (QDs).

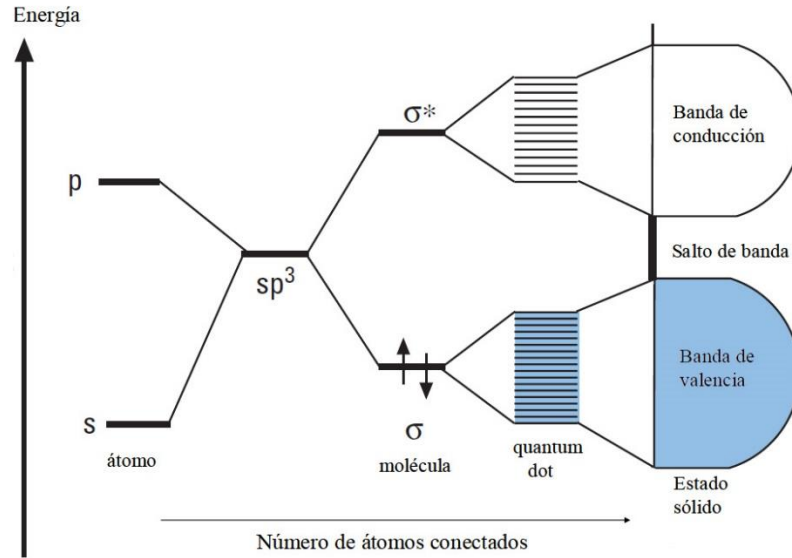
## **A.2. QUANTUM DOTS**

### **A.2.1. Definición y propiedades**

Los QDs son nanopartículas semiconductoras luminiscentes conocidos como fluoróforos de nueva generación. Estos nanocristales de entre 2 y 10 nanómetros de diámetro han ido adquiriendo importancia durante los últimos 20 años debido a su reducido tamaño, que les confiere interesantes propiedades optoelectrónicas dominadas por los efectos de confinamiento cuántico, lo que aporta importantes ventajas con respecto a los colorantes orgánicos y las proteínas fluorescentes (4) (5).

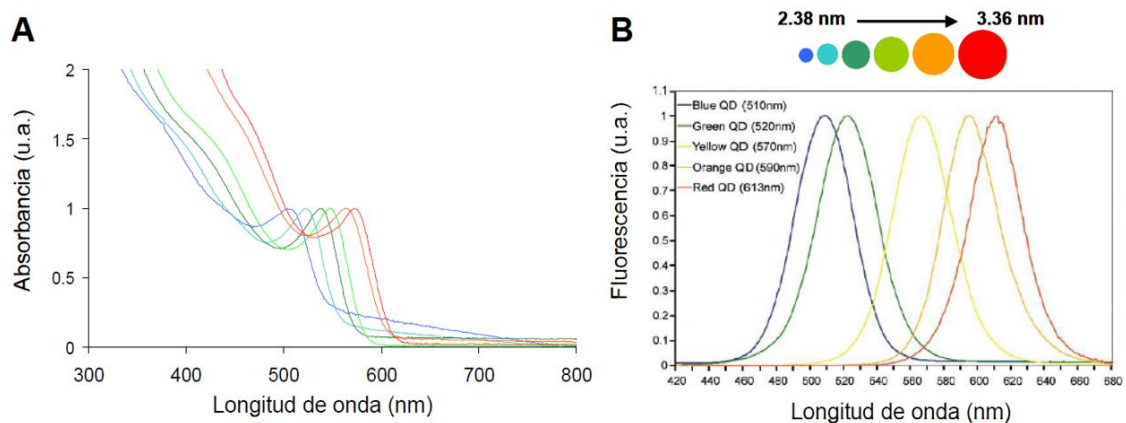
Están constituidos por un núcleo de cientos e incluso miles de átomos de elementos pertenecientes a los grupos II-VI, III-V, ó IV de la Tabla Periódica. Su núcleo inorgánico suele estar rodeado de moléculas tensoactivas (ligandos) que aportan estabilidad en medios líquidos (evitando agregaciones por atracciones electrostáticas entre los núcleos de los nanocristales), formando disoluciones coloidales (6).

Los niveles de energía en estos semiconductores están cuantizados, cuyos valores están relacionados con el tamaño de estos. Los semiconductores convencionales presentan un “salto de banda” o “band gap”, determinada por la distancia existente entre la banda de conducción y la banda de valencia del mismo, así la energía mínima que necesita un electrón para llegar a la banda de conducción está establecida y es fija. Cuando el tamaño del semiconductor es de una escala nanométrica, su tamaño es del orden de las longitudes de onda asociadas a los portadores de carga (electrones y huecos), y es por esto que los niveles de energía pasan a estar cuantizados, y el salto de banda está directamente relacionado con el tamaño del semiconductor (**Figura 1**) (7).



**Figura 1.** Diagrama de niveles de energía típicos en función del número de átomos que constituyen el nanocrystal. A medida que aumenta el número de átomos, los niveles discretos de los orbitales atómicos se convierten en bandas de energía (semiconductor convencional) (7).

Cuanto menor sea el tamaño de la nanopartícula, el salto de banda es mayor y, por lo tanto, la longitud de onda de emisión es menor. La absorción de un fotón con una energía superior a la del salto de banda supone la creación de un par hueco/electrón (excitón o plasmón). Dicha absorción tiene lugar a mayores energías, es decir, a menores longitudes de onda, generándose así un ancho espectro de absorción. Se concluye entonces que las propiedades ópticas de los QDs están relacionadas con la composición y tamaño de los mismos (**Figura 2**) (8).



**Figura 2.** Espectros de absorción (A) y emisión (B) de QDs de diferentes tamaños compuestos de un núcleo de CdSe y recubrimiento de ZnS (8).

La recombinación del par hueco/electrón está caracterizada por una vida media relativamente larga (mayor de 10 ns) y la emisión de un fotón se produce en una banda de energía estrecha y simétrica. Esta larga vida media de la fluorescencia hace posible el uso de “medidas a tiempo resuelto”, permitiendo separar la señal de emisión procedente de los QDs de otras emisiones con una vida media menor, aumentando así la sensibilidad de detección, dado que minimiza problemas de solapamiento de bandas (9).

En ocasiones, la interacción de especies presentes en el entorno de la nanopartícula con los átomos de la superficie de esta, crea defectos en su superficie que actúan reteniendo temporalmente el electrón o el hueco, quedando en ese estado de mínima energía, por lo que la recombinación se ve desfavorecida. El “atrapamiento” y “desatrapamiento” provocan una fluorescencia intermitente que se denomina “blinking”, y se traduce en una disminución del rendimiento cuántico. Una manera de evitar esto es hacer crecer una capa protectora de otro material con un salto de banda mayor sobre la superficie del nanocrystal (10).

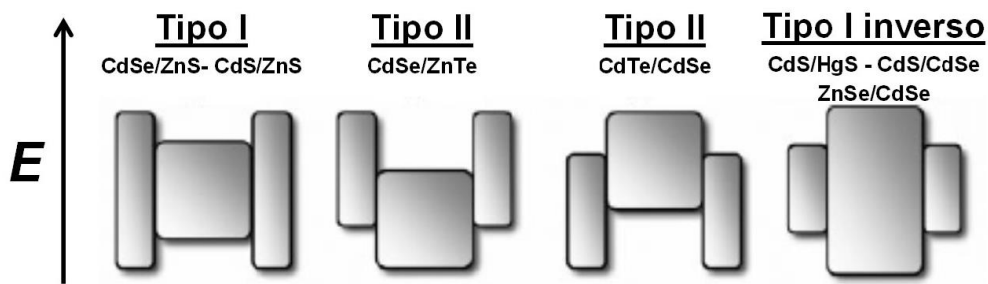
Teniendo en cuenta todo lo anterior se deduce que, variando el tamaño y la naturaleza del nanocrystal, se puede obtener una emisión fotoluminiscente que abarca un rango espectral amplio, desde el UV al infrarrojo. De este modo es posible realizar la excitación simultánea de nanopartículas de distintos tamaños o, dicho de otra manera, distintas longitudes de onda de emisión, a una misma longitud de onda de absorción (puesto que los espectros de absorción son anchos). Esto es interesante en el desarrollo de sensores luminiscentes multianalito, donde QDs de diferentes tamaños presentan diferentes emisiones, pudiendo actuar como marcadores de diferentes biomoléculas (9).

Otras características interesantes son la posesión de una elevada fotoestabilidad, así como altos coeficientes de extinción molar y rendimientos cuánticos de fluorescencia elevados, permitiendo exponerse a tiempos de exposición más largos que los fluoróforos convencionales sin perder eficiencia luminiscente (3).

### **A.2.2. Composición**

Los QDs más utilizados son los formados por los elementos de los grupos 12-16 y 14-16 de la Tabla Periódica, como los QDs de sulfuro de zinc (ZnS), sulfuro de cadmio (CdS) o seleniuro de cadmio (CdSe) entre otros. En la actualidad, además, la tendencia es al uso

de QDs de estructura tipo núcleo/recubrimiento (core/shell), como los QDs de CdSe/ZnS y CdSe/CdS. El fundamento consiste en la síntesis de una capa de material semiconductor, diferente del núcleo que compone el QD, alrededor de dicho nanocrystal. El salto de banda del material semiconductor que recubre es diferente del valor del semiconductor del núcleo, por lo que, dependiendo del salto de banda y de la posición de los niveles de energía electrónica de los semiconductores en cuestión, el recubrimiento permite generar un desplazamiento de la emisión a longitudes de onda mayores. Según esto, se pueden determinar tres tipos de alineaciones diferentes como se observa en la **Figura 3** (6).



*Figura 3. Representación esquemática de la alineación de los niveles de energía de los sistemas núcleo/recubrimiento. Los bordes superiores e inferiores de las formas externas se corresponden con las bandas de conducción y valencia del recubrimiento respectivamente, y los superiores e inferiores de las formas internas se corresponden con las bandas de conducción y valencia del núcleo respectivamente (6).*

En la alineación Tipo I, el salto de banda del recubrimiento es mayor que el del núcleo. Los electrones y huecos se encuentran confinados en el núcleo, favoreciéndose el proceso de emisión luminiscente.

Se observa en la alineación Tipo II, que o la banda de valencia o la banda de conducción del semiconductor, coinciden con el salto de banda del núcleo, por lo que, si se produce la excitación del nanocrystal, tiene lugar una separación del electrón y del hueco en diferentes regiones de la nanopartícula, generándose así excitones de mayor duración antes de que ocurra la recombinación. Dicho fenómeno es más marcado en este tipo de alineamientos que en los de Tipo I.

Por último, la alineación Tipo I inverso se caracteriza por un salto de banda del recubrimiento menor que el del núcleo. Aquí, el espesor del recubrimiento es importante, porque dependiendo de este, los electrones y los huecos estarán parcial o totalmente confinados en el recubrimiento, lo que permite controlar la emisión luminiscente de la

nanopartícula. Añadiendo una segunda capa de un semiconductor con un mayor salto de banda, la estabilidad de la emisión luminiscente y el rendimiento cuántico de las nanopartículas mejora.

Un requisito necesario para trabajar con estos tipos de QDs es que ambos semiconductores cristalicen en la misma fase cristalina para que se asegure la ausencia de defectos en la interfase o en el recubrimiento (6).

### **A.2.3. Síntesis**

Las estrategias más utilizadas para la síntesis de QDs son las conocidas como “top-down” y “bottom-up” (11). La técnica de “top-down” consiste en la obtención de QDs embebidos en estructuras compuestas por láminas finas de otros semiconductores. La vía “bottom-up” obtiene QDs en forma de suspensión coloidal homogénea tras la reacción de sus precursores en disolución acuosa. Esta vía es la más habitual en los laboratorios de Química, ya que da lugar a nanocristales de tamaño y forma controlados, y será la seguida en el presente Trabajo de Fin de Máster.

Los QDs coloidales se obtienen a partir de la reacción de una mezcla compuesta por reactivos precursores, que se descomponen y forman nuevas especies reactivas llamadas monómeros, provocando la nucleación y el crecimiento del nanocristal en estado líquido en un reactor. El reactor proporciona la energía necesaria para descomponer dichos precursores, por colisiones térmicas o por reacción química entre el medio líquido y los precursores, o por una combinación de ambos mecanismos.

El crecimiento de los nanocristales viene determinado por la presencia de agentes coordinantes o surfactantes, moléculas que adsorben sobre la superficie de los QDs. Deben ser lo suficientemente móviles como para permitir el acceso de más unidades de monómero, y estables, para prevenir la agregación de los nanocristales. La adherencia no debe ser ni demasiado fuerte ni demasiado débil, porque de ser así no se permitiría el crecimiento en el caso de que fueran fuertes, o el crecimiento sería demasiado marcado en el caso de interacciones débiles, formándose agregados. Cuando se disminuye la temperatura, se interrumpe el crecimiento de la nanopartícula, uniéndose por lo tanto la nanopartícula de una manera más fuerte a la superficie del QD. La presencia de moléculas coordinantes permite controlar el tamaño de la nanopartícula durante el proceso de



síntesis, controlando la proporción de las mismas, el volumen de inyección, la concentración de monómero, o el tiempo de reacción.

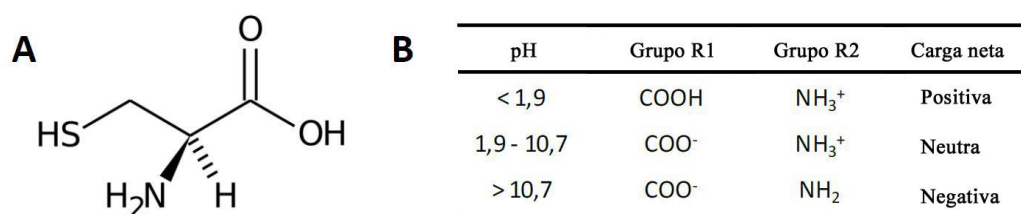
Después de la síntesis de los QDs, estos son monodispersos y estables, pero hidrofóbicos. Estas nanopartículas están cubiertas con una capa hidrofóbica de cadenas carbonadas, de este modo solo son solubles en disolventes no polares, por lo que su aplicación analítica y biológica está limitada. Es por esto que es necesario someterlas a un proceso de solubilización en medios acuosos, realizando modificaciones en su superficie.

#### A.2.4. Solubilización en medios acuosos

Para conseguir una solubilización efectiva de los QDs en medios acuosos, lo que se busca es dotarles de biocompatibilidad, para que además de ser solubles, sean estables, manteniendo sus propiedades luminiscentes, su tamaño y, además, la posibilidad de añadir otros grupos funcionales de interés en los ensayos.

Son tres las principales estrategias de solubilización de las nanopartículas en medios acuosos (12):

- 1) *Intercambio de ligandos hidrofóbicos por ligados hidrofílicos*: consiste en reemplazar las moléculas hidrofóbicas que rodean el QD por moléculas bifuncionales que contienen, generalmente, un grupo tiol (-SH) en el extremo, que se une a la superficie de la nanopartícula, y un grupo funcional polar en el otro. El grupo polar es el que aporta la solubilidad en medios polares. A determinados pH, los grupos polares (carboxílico o sulfónico) están desprotonados, y la carga negativa genera repulsión electrostática entre las nanopartículas, evitando su agregación (**Figura 4**).



**Figura 4.** A) Estructura de la L-cisteína. B) Comportamiento de los grupos funcionales de la cisteína en función del pH.

- 2) *Silanización*: se basa en la formación de una capa de sílice alrededor de la superficie del nanocrystal con mercaptopropil(trimetoxi)silano (MPS) como precursor. Aquí también se produce una sustitución de los ligandos hidrofóbicos. Se trata de una técnica compleja y difícil de controlar, por lo que no siempre se obtienen recubrimientos homogéneos y, como consecuencia, las nanopartículas se agregan.
- 3) *Interacción hidrofóbica con polímeros anfifílicos*: como su propio nombre indica, se basa en la interacción hidrofóbica de las cadenas carbonadas de un polímero anfifílico con las cadenas carbonadas de los ligandos que recubren la superficie de las nanopartículas. La solubilidad vendrá determinada por la disposición hacia el exterior de los grupos hidrofílicos del polímero. Los QDs poseerán mayor rendimiento cuántico de fluorescencia y serán más estables que los tratados en el primer punto, por el hecho de conservar los agentes coordinantes originales durante el proceso de modificación.

### **A.2.5. Inmovilización**

El uso de nanopartículas es hoy una tendencia clara en el desarrollo de nuevos y mejorados sensores ópticos. Sin embargo, un requisito fundamental consiste en llevar a cabo la inmovilización de las nanopartículas coloidales en soportes sólidos, conservando sus propiedades de detección y evitando la lixiviación en la solución (13). Así, en el desarrollo de los sensores luminiscentes, a utilizar en el presente Trabajo de Fin de Máster, se inmovilizan QDs en soportes sólidos para crear así la fase sólida activa.

Es importante determinar el tipo de análisis que se va a realizar para escoger el procedimiento de inmovilización de las nanopartículas que mejor se adapte a los requerimientos. Los tipos de inmovilización pueden ser por:

- *atrapamiento físico*
- *unión covalente*
- *enlaces coordinados*

Todas las técnicas deben tener en cuenta la proximidad requerida entre los QDs y el medio de reconocimiento, así como el tamaño y la movilidad que va a presentar el analito.

Las fases sensoras basadas en matrices inorgánicas sol-gel se elaboran atrapando la nanopartícula dentro de dicha estructura inorgánica durante el proceso de polimerización sol-gel. Este tipo de soportes aportan gran estabilidad y resistencia a la degradación, además de las características propias de los QDs, que los convierten en interesantes biosensores. Algunos inconvenientes de este tipo de dispositivos son los cambios de polaridad, reacciones sobre la superficie de los QDs durante el proceso sol-gel, o la lixiviación de los nanocristales durante el proceso de medida (13).

### **A.2.6. QDs dopados**

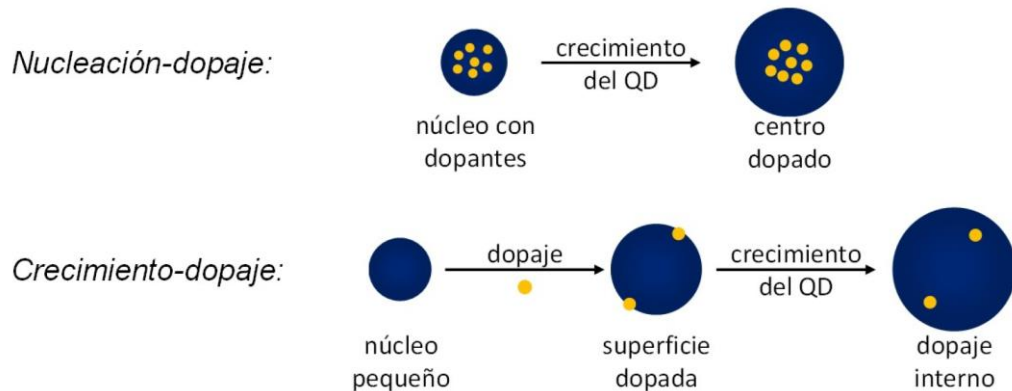
Mediante el dopaje de QDs con metales durante su síntesis, se persigue alcanzar una mejora de sus propiedades luminiscentes. Dopar estos nanocristales con metales de transición como  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  o lantánidos como  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$  o  $\text{Sm}^{3+}$ , permite activar la luminiscencia de los mismos, ampliando el intervalo útil de propiedades espectroscópicas. La utilización de lantánidos es menos favorable, debido a que sus propiedades químicas difieren de los cationes metálicos que componen el núcleo del semiconductor, por lo que la optimización es más compleja (14).

Existen varios métodos de obtención de QDs dopados (d-dots) que son (15):

- *Métodos de síntesis en fase acuosa:* los átomos de impurezas se distribuyen uniformemente en el nanocristal, además de que es posible controlar el tamaño y forma de los QDs en formación.
- *Métodos de síntesis en fase orgánica:* aquí se utilizan disolventes orgánicos y elevadas temperaturas. La superficie de los QDs se mejora disminuyéndose los defectos superficiales. El inconveniente de esta técnica radica en la dificultad de incorporación de dopantes en su estructura, por el pequeño tamaño de los nanocristales (compuestos por un menor número de átomos) y por el proceso de “autopurificación” que experimentan las nanopartículas (fundamentos termodinámicos) debido a que la difusión de la impureza es menor en el material semiconductor, los nanocristales son difíciles de dopar y las impurezas son expulsadas. Si el proceso de dopaje está controlado por factores cinéticos, las impurezas son absorbidas la mayoría en la superficie del nanocristal, por tratarse de un enlace favorable.

En el proceso de introducción de impurezas en la estructura del QDs durante el proceso de síntesis en fase orgánica, se han descrito principalmente tres vías:

- *Introducción junto los precursores que forman el núcleo del QD*: se introducen simultáneamente los precursores de los iones dopantes y de los elementos que forman el nanocrystal. Los inconvenientes son la obtención de un porcentaje alto de QDs sin dopar e impurezas adsorbidas en la superficie.
- *Introducción antes de que se produzca la formación del núcleo (nucleación-dopaje)*: antes de que se produzca la formación del núcleo, la introducción de los precursores de los iones dopantes permite la formación de un núcleo con dopantes, por lo que al crecer el QDs, el resultado será un QD con el centro dopado (**Figura 5, esquema superior**).
- *Introducción durante la formación del recubrimiento del QD (crecimiento-dopaje)*: cuando ya está formado el núcleo, se procede al dopaje simultáneamente con el crecimiento de la superficie, lo que da lugar a una superficie dopada y, como resultado, un QD con dopaje interno (**Figura 5, esquema inferior**).



**Figura 5.** Vía de introducción de dopantes antes de que se produzca la formación del núcleo (esquema superior) y vía de introducción de dopantes durante la formación del recubrimiento del QD (esquema inferior).

Es interesante tener en cuenta las variaciones de presión y temperatura utilizados durante la síntesis, puesto que pueden modificar la emisión luminiscente de los d-dots. La temperatura produce un descenso en la intensidad de emisión luminiscente para QDs tipo

Mn:ZnS, dado que afecta a la interacción excitón-fotón y la velocidad de transferencia de energía desde el excitón al ion dopante. Así mismo, un aumento de la presión provoca cambios en la intensidad de emisión, debido a que se produce un decrecimiento en la distancia interatómica, incrementándose así el solapamiento entre los orbitales electrónicos contiguos, y obteniéndose el mismo resultado (14).

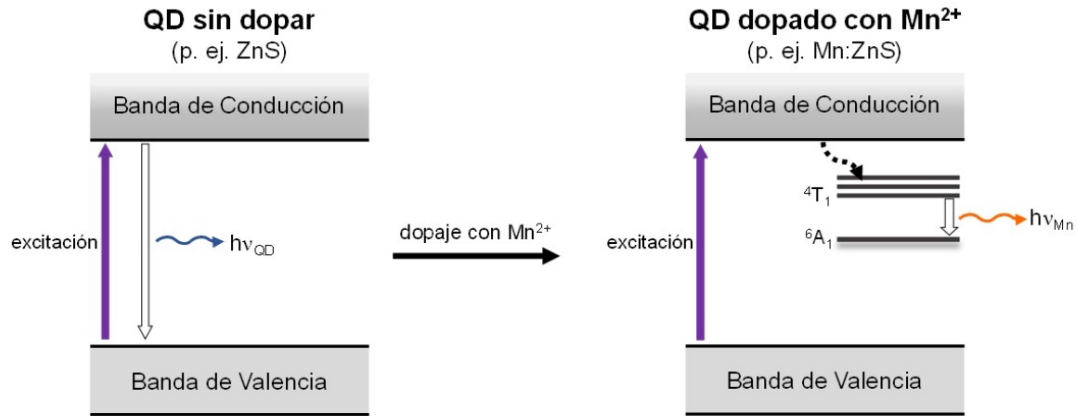
#### *A.2.6.1. Propiedades luminiscentes de los QDs dopados con $Mn^{2+}$*

En este apartado se lleva a cabo un análisis de las propiedades luminiscentes de los QDs dopados con  $Mn^{2+}$  por ser estos los utilizados en el presente Trabajo de Fin de Máster. En este caso, la composición del QD empleado es ZnS, la longitud de onda de emisión del dopante es principalmente 590 nm, el tiempo de vida en torno a milisegundos, y el rendimiento cuántico del 10 al 60% (7).

Al introducir iones dopantes de  $Mn^{2+}$  en la estructura del QD, se produce una interacción entre los estados electrónicos d del  $Mn^{2+}$  y los estados s-p de las bandas del semiconductor que constituye la nanopartícula, proporcionándole sobre todo una intensa emisión fotoluminiscente con largos tiempos de vida media (3).

La emisión fotoluminiscente de los d-dots dopados con  $Mn^{2+}$  se desarrolla fundamentalmente mediante dos métodos diferentes. El primero de ellos está basado en la presencia de los estados energéticos del  $Mn^{2+}$  dentro del salto de banda del semiconductor; el segundo de ellos, y menos común, tiene lugar cuando los niveles energéticos del  $Mn^{2+}$  no se encuentran dentro del salto de banda del nanomaterial (14). En este Trabajo de Fin de Máster se está dentro de la primera situación, por lo que es esta la que se analiza a continuación.

En el primer caso se utilizan QDs formados por semiconductores de ZnS, ZnSe o CdS, cuya diferencia de energías entre la banda de valencia y la banda de conducción es tan alta que los niveles energéticos del  $Mn^{2+}$  se encuentran dentro del salto de banda de la nanopartícula (**Figura 6**).



*Figura 6. Proceso de emisión luminiscente de QDs dopados con  $Mn^{2+}$ .*

Como se observa en la figura, una vez se ha excitado el QD, tiene lugar una transferencia de energía desde los niveles energéticos excitados del material semiconductor a los niveles energéticos excitados del  $Mn^{2+}$ , registrándose en ese momento una desactivación radiacional debida a la transición que se produce del primer estado excitado del  $Mn^{2+}$  ( $^4T_1$ ) a su estado fundamental ( $^6A_1$ ). Por separado, la transición  $^4T_1 - ^6A_1$  del  $Mn^{2+}$  está prohibida por el spin, lo que da lugar a constantes de desactivación del estado excitado por vía radiacional muy bajas, así como bajos coeficientes de extinción molar para las absorciones de energía correspondientes a las transiciones entre los estados  $^6A_1$  y  $^4T_1$  (16). Por lo tanto, la emisión que se produce al dopar el QD con  $Mn^{2+}$  presenta altos rendimientos cuánticos (debido a esa transición prohibida es muy energética) y tiempos de vida media largos, en torno a milisegundos, más elevado que los QDs fluorescentes convencionales (ns). Estos largos tiempos de vida permiten evitar las interferencias propias de la autofluorescencia y la luz dispersada (3).

Basándose en estas interacciones, se puede variar la concentración de  $Mn^{2+}$  que se incorpora, de tal manera que se obtengan simultáneamente QDs y d-dots y, como resultado, dos máximos de emisión localizados a 420-470 y 590 nm respectivamente. Puesto que en los d-dots la emisión es menos energética que la debida al salto de banda del semiconductor, dicha emisión no es absorbida por el QD, minimizándose así los problemas de autoabsorción.

#### ***A.2.6.2. Aplicaciones analíticas de los QDs de Mn:ZnS***

La nanotecnología se ha convertido en un campo de investigación y desarrollo que sobrepasa los límites a los que se encontraban sometidos las técnicas desarrolladas hasta el momento. Progresivamente se está consiguiendo implementar nano-objetos y nano-dispositivos con el objetivo de obtener nano-máquinas, con un efecto positivo de cara a su aplicación a diversos sectores, como pueden ser aplicaciones médicas para diagnóstico o producción y almacenamiento de energía (11).

Los campos más típicamente involucrados en el empleo de la nanotecnología son la nanobiotecnología, los nanomateriales, la nanoelectrónica o el desarrollo de sensores. En este sentido y fundamentado en la utilización de la luminiscencia de los QDs como indicador químico, el presente Trabajo de Fin de Máster se desarrolla empleando esas nanopartículas como fases sensoras, en las que se espera observar un cambio de luminiscencia al interaccionar directamente con un analito, como es la acetona en este caso, produciéndose una desactivación de las propiedades fosforescentes típicas de los QDs de Mn:ZnS. El estado de la superficie del QD determina la luminiscencia que este produce, y esto es en lo que se basa la interacción especie química-nanopartícula, dándose cambios en la eficiencia de la recombinación del par hueco-electrón. La mayoría de las aplicaciones analíticas que utilizan QDs como indicadores directos, están basadas en las medidas de la desactivación de la fluorescencia que se produce como consecuencia de la interacción física y química con un determinado analito.

En este sentido, recientemente se ha descrito análisis de acetona disuelta en aguas mediante el empleo de medidas de desactivación de la fotoluminiscencia de QDs de Mn:ZnS QDs (3) e inmovilizados en una matriz sol-gel que interaccionan con un flujo de agua contaminada (13). El dopaje de estas nanopartículas de ZnS con iones  $Mn^{2+}$  provoca que los tiempos de vida del fenómeno luminiscente sean mucho más largos que la emisión fluorescente de los QDs sin dopar. Este hecho, junto a la separación entre la longitud de onda de excitación y emisión (típico de los comportamientos fosforescentes) hace posible la realización de medidas a tiempo resuelto, útil en estudios biológicos y médicos. Por último, destacar la ausencia de metales tóxicos en la estructura del nanocristal, minimizándose así los problemas de toxicidad de los QDs de base Cd habitualmente utilizados (p.ej. CdSe o CdS).

Otro tipo de aplicaciones en auge en la vía de los sensores, las constituyen los biosensores. Consiste en la conjugación de la superficie del QD con la biomolécula en estudio, obteniéndose una alta especificidad y funcionalidad biológica, sumando además de este modo las características típicas que las nanopartículas aportan. Las moléculas que se suelen conjugar son anticuerpos, biotina-estreptavidina, enzimas, o incluso anticuerpos. Las formas de ensayo más empleados son los conocidos como inmunoensayos, llevándose a cabo una conjugación del QD tanto con el anticuerpo como con el antígeno; o la transferencia de energía (FRET), un proceso no radiativo de transferencia de energía de excitación que tiene lugar a través de un donador en su estado excitado (habitualmente un fluoróforo) al estado fundamental de un aceptor cercano, a través de interacciones dipolo-dipolo, minimizándose de este modo las fugas de emisión del donador en la detección de longitud de onda del aceptor, que permite un mejor solapamiento espectral (17).



## ***B. OBJETIVO***

A lo largo del apartado “A. *INTRODUCCIÓN*” expuesto, ha quedado plasmada la gran importancia que han adquirido en los últimos años el desarrollo de metodologías de análisis basadas en la nanotecnología. Las ventajas que aporta la utilización de materiales nanométricos los han convertido en una de las principales bases en las líneas de investigación actuales, particularmente aquellos relacionados con nanopartículas luminiscentes semiconductoras.

En esta línea, se ha hecho hincapié en las múltiples ventajas que ofrecen los QDs en comparación con los luminóforos convencionales para su aplicación a metodologías fotoluminiscentes de análisis. Numerosos grupos de investigación internacionales han conseguido sintetizar nanopartículas luminiscentes coloidales con elevada estabilidad, reducida toxicidad, e interesantes propiedades luminiscentes cuando son dopadas con impurezas metálicas (adquisición de propiedades similares a la fosforescencia).

En este contexto, el principal objetivo del presente Trabajo de Fin de Máster ha consistido en la síntesis y caracterización de QDs con núcleo de ZnS dopados con  $\text{Mn}^{2+}$  sensibles a la exposición de determinadas especies químicas de interés industrial y/o medioambiental, para evaluar finalmente su aplicación como fase sensora a un prototipo instrumental portátil en desarrollo, estableciéndose de este modo una sencilla metodología analítica en problemas de contaminación ocupacional. Se ha seleccionado la acetona como analito modelo a ser monitorizado, debido al interés por la determinación en atmósferas contaminadas, sobre todo en ambientes de trabajo.

El desarrollo de este objetivo principal ha sido alcanzado a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Síntesis coloidal de Mn:ZnS QDs directamente solubles en medios acuosos.
2. Caracterización de las nanopartículas sintetizadas a través de su tamaño y forma, su emisión luminiscente, y teniendo en cuenta las variables químicas e instrumentales que pudieran repercutir en su luminiscencia.
3. Empleo de un procedimiento sencillo y general para la inmovilización de Mn:ZnS QDs en un soporte sólido estable, inerte y transparente, como vía de desarrollo de sensores ópticos.

4. Caracterización de las nanopartículas inmovilizadas en el soporte sólido mediante su emisión luminiscente, registrando las posibles modificaciones que pudieran darse en su luminiscencia tras una exposición a concentraciones crecientes de acetona.
5. Implementación de la fase sensora luminiscente basada en QDs dopados con  $\text{Mn}^{2+}$  inmovilizados en una matriz inorgánica sol-gel a un prototipo instrumental (luminóforo portátil) en desarrollo para la determinación de acetona en aire contaminado.
6. Evaluación de las características de funcionamiento del sistema sensor construido mediante el acoplamiento de la fase sensora sol-gel al prototipo instrumental.

### ***C. EXPERIMENTAL***

## C.1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

En este apartado se procede a la descripción detallada de los instrumentos y reactivos utilizados a lo largo de toda la experimentación.

### C.1.1. Instrumentación

- Espectrómetro de luminiscencia Varian Cary Eclipse (Varian Ibérica) equipado con lámpara de descarga de xenón (potencia de pico equivalente a 75 KW), monocromadores Czerny-Turner y detección mediante tubo fotomultiplicador modelo R-298. El programa de control y tratamiento de datos, Cary Eclipse, opera bajo entorno Windows.
- Microscopio electrónico de transmisión (TEM) modelo MET JEOL-2000 EX-II (Jeol, USA).
- pHmetro modelo micro pH2000 (Crison Instruments, España).
- Balanza Precisa 180A, con precisión de hasta  $\pm 0.01$  mg (Precisa, Suiza).
- Rotámetro Sho-Rate (Brooks Instrument, USA).
- Baño de ultrasonidos (J.P. Selecta, España).
- Estufa de laboratorio Memmert modelo 100 (Mettler, Alemania).
- Equipo de agua Milli-Q plus, 185 (Millipore, USA).
- Ultracentrífuga Biofuge Stratus (Heraeus, Alemania).
- Manta calefactora modelo Fibroman-N (J.P. Selecta, España) acoplada a un sistema de control digital de temperatura modelo Electemp (J.P. Selecta, España).
- Agitador magnético modelo RCT basic (Ika Werke, Alemania).
- Línea de vacío.
- Lámpara UV con longitud de onda de emisión de 365 nm 6 W (Vilber Lourmat, Alemania).
- Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd.).
- Prototipo instrumental del Área de Tecnología Electrónica de la Universidad de Oviedo.
- Fuente de alimentación Velleman PS 613 (Velleman, Bélgica).
- Fuente de alimentación Silver Electronics EP 613 (Silver Sanz, España).
- Voltímetro HP 34401A Multimeter (HP, USA).

### **C.1.2. Material**

- Celda de cuarzo convencional para medidas de luminiscencia Hellma, modelos 101-QS y 114F-QS, de 10 mm de paso óptico.
- Celda de flujo modelo 176.052-QS.
- Micropipetas Labmate y Finnipetter de volúmenes ajustables comprendidos entre 0.5  $\mu$ L y 1 mL.
- Tubos Eppendorf con volumen de 1.5 mL.
- Material volumétrico de vidrio de calidad contrastada.
- Tamices con diversos diámetros.
- Mortero de ágata.

### **C.1.3. Reactivos y disoluciones**

Los reactivos empleados son de calidad analítica y han sido utilizados sin la realización de ningún tipo de purificación previa. Las disoluciones acuosas se han preparado disolviendo la cantidad adecuada de sólido en agua ultrapura desionizada obtenida a partir de un sistema Milli-Q System.

Para la síntesis de QDs se ha utilizado:

- Sulfuro de sodio nanohidratado (Sigma-Aldrich).
- L-cisteína hidrociorada monohidratada (Merck).
- Cloruro de zinc heptahidratado (Merck).
- Cloruro de manganeso tetra hidratado (Merck).
- Ácido clorhídrico (Merck).
- Hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich).
- Etanol (Prolabo).

Los reactivos utilizados para la fabricación de la matriz sol-gel son:

- (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES) (Fluka Chemie).
- Tetrametoxisilano (TMOS) (Fluka Chemie).
- N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrociorada (EDC) (Fluka).
- Etanol (Prolabo).

- Hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich).
- Ácido clorhídrico (Merck).

Reactivos y disoluciones para caracterización y desarrollo experimental:

- Disolución reguladora: Buffer de fosfatos (PBS) 10 mM pH 7.4.
- Acetona (Fisher Chemical).
- Cloroformo estabilizado con etanol (Romil).
- Argón (Air Liquide).
- Aire sintético comprimido (Air Liquide).

## C.2. SÍNTESIS DE QDs FOSFORESCENTES

Se han sintetizado QDs de ZnS dopados con  $\text{Mn}^{2+}$ , con el objetivo de obtener nanopartículas con propiedades semejantes a la fosforescencia. Para que estas fases sean solubles en medios acuosos y así poder caracterizarlos en medio líquido, se estabilizaron con un recubrimiento superficial de L-cisteína.

La metodología seguida para la síntesis fue la utilizada por E. Sotelo-González y col. (13) y que se ilustra en la **Figura 7**. En una primera etapa, se prepararon disoluciones acuosas que, posteriormente, fueron introducidas en un vaso de precipitados en el siguiente orden: 5 mL de  $\text{ZnCl}_2$  0.1 M, 0.15 mL de  $\text{MnCl}_2$  0.1 M (10% HCl), 50 mL de L-cisteína y 0.15 mL de agua Milli-Q. La mezcla se llevó a pH 11 con NaOH 1 M, y a continuación se vertió todo en un matraz de tres bocas localizado en una manta calefactora equipada con un termopar y un controlador de temperatura.

Se desoxigenó la mezcla durante 30 minutos bajo constante agitación y atmósfera de argón. Inmediatamente después, se inyectaron 5 mL de  $\text{Na}_2\text{S}$  0.1 M y, sin modificar las condiciones, se dejó otros 20 minutos. Esto permitió la nucleación de las nanopartículas.

Con el objetivo de someter a las nanopartículas a un proceso de envejecimiento para incrementar la cristalinidad de la L-cisteína y disminuir los defectos superficiales, se elevó la temperatura a 50°C, se cortó el flujo de argón, y se dejó destapado durante 2 horas sin interrumpir la agitación.

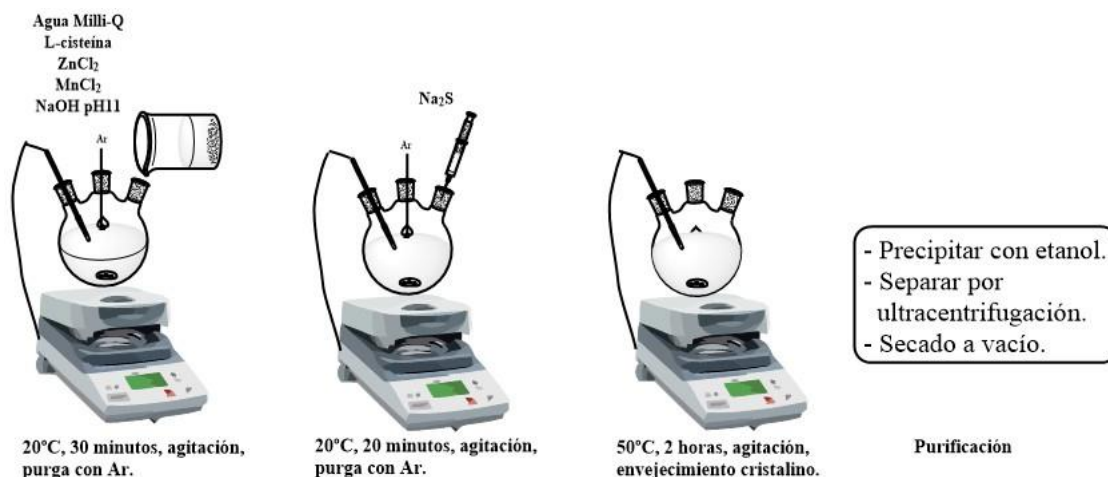


Figura 7. Proceso de síntesis Mn:ZnS QDs.

Le siguió un proceso de purificación en el que se eliminó el exceso de reactivos. Para ello fue necesario realizar varios lavados del sólido obtenido con etanol, intercalados con procesos de ultracentrifugación a 5000 rpm para eliminar el sobrenadante con los reactivos en exceso (2x15 minutos y 2x5 minutos).

El precipitado obtenido (aglomerado de nanopartículas) se secó en una línea de vacío, y se recogieron finalmente los QDs solubles en medio acuoso como un polvo de color marrón. La solubilidad, como se explicó en el apartado “A.2.4. Solubilización en medios acuosos”, viene determinada por los grupos tiol (-SH) y carboxílico (-COOH) de la L-cisteína, además de que evita su agregación gracias a la carga negativa que aporta, generando repulsión electrostática entre las nanopartículas.

### C.3. CARACTERIZACIÓN

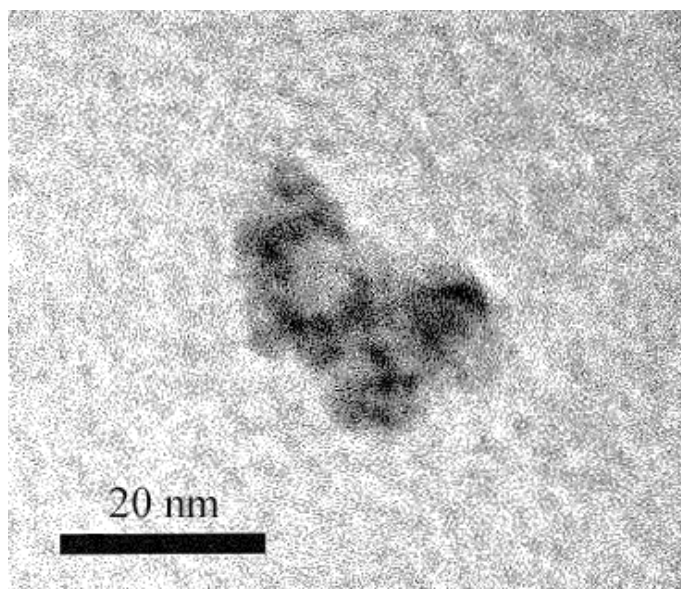
Para determinar si los QDs sintetizados son aptos para el estudio que se desea llevar a cabo, se sometieron a un proceso de caracterización mediante el cual se pudo conocer el tamaño, forma y comportamiento químico ante el agente al que se someterían en lo sucesivo. Todos los resultados obtenidos fueron valorados en comparación con los fosforóforos tradicionales.



### C.3.1. Tamaño y forma

Se comprobó que los QDs sintetizados poseían el tamaño adecuado mediante la técnica de microscopía de transmisión electrónica (TEM), ya que constituye una manera sencilla y precisa de obtención de datos.

Se adquirieron fotografías de una rejilla de cobre en la que previamente se depositó una pequeña cantidad de disolución de Mn:ZnS QDs en PBS. Se muestra en la **Figura 8** una de las fotografías tomadas, donde se puede comprobar que el tamaño de las nanopartículas se encuentra en torno a 3-4 nm, por lo que se ha conseguido el tamaño apropiado.



*Figura 8. Imagen TEM de una solución de Mn:ZnS QDs en buffer PBS.*

Se aprecia también en la imagen que los QDs se encuentran formando agregados, esto es porque en TEM las condiciones de medida exigen que las nanopartículas depositadas sobre la rejilla estén en alto vacío, por lo que en el proceso de deposición-secado de los nanocristales pueden producirse agregaciones indeseadas de los mismos. Alternativamente, una técnica muy utilizada para caracterización directa de las nanopartículas en medio acuoso consiste en realizar medidas de dispersión de luz dinámica (DLS).

La técnica DLS permite obtener información sobre la distribución de tamaños de los QDs. Los datos resultantes se corresponden con el diámetro hidrodinámico de la nanopartícula, considerándose además del núcleo del nanocrystal, los ligandos que lo rodean y las moléculas del disolvente. Se basa en las medidas de las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada, determinándose de este modo el coeficiente de difusión de la partícula que, finalmente, se relaciona directamente con su tamaño hidrodinámico.

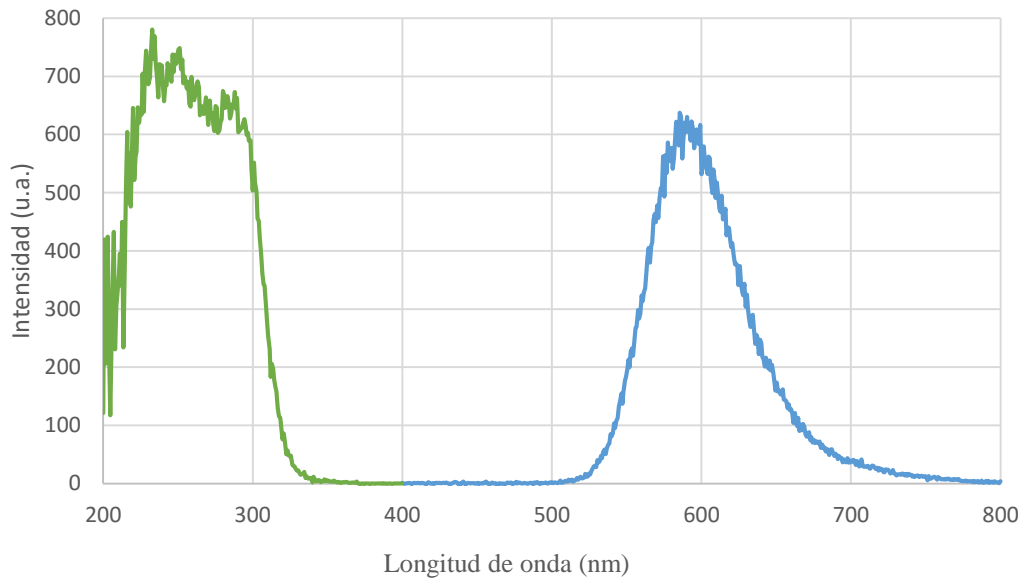
Tras realizar las medidas de DLS en los Mn:ZnS QDs sintetizados, se concluyó que el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas alcanza un valor medio cercano a los 3 nm.

### **C.3.2. Características fotoluminiscentes**

Se ha desarrollado un estudio de las propiedades fotoluminiscentes de los QDs sintetizados, realizando medidas de espectroscopía fluorescente/fosforescente en discontinuo. Todas las medidas se realizaron en una celda de luminiscencia de cuarzo convencional (Hellma, modelo 101-QS) de 10 mm de paso óptico. Los parámetros necesarios para trabajar en el software fueron optimizados de tal manera que se obtuvo la mayor sensibilidad en la detección de la luminiscencia de los Mn:ZnS QDs.

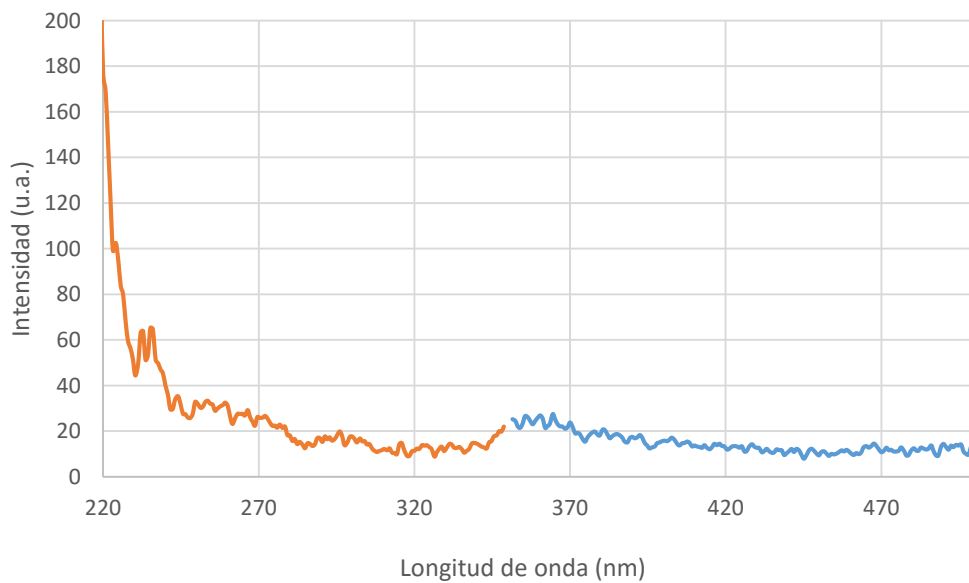
En función de los resultados obtenidos en la **Figura 9** y la **Figura 11**, se determinó que las longitudes de onda de excitación y emisión se localizan a 290 y 590 nm respectivamente, por lo que se está produciendo fosforescencia, producto de la transición prohibida ( $^4T_1$  a  $^6A_1$ ), y que el resto de parámetros para los sucesivos análisis se establecen como sigue:

- Excitación: 290 nm
- Emisión: 590 nm
- Tiempo de retardo o tiempo tras el cual se comienza a registrar la emisión (td): 0.1 ms
- Tiempo de apertura o tiempo durante el cual se registra la señal (tg): 2 ms



*Figura 9. Espectros de excitación y emisión fosforescente de una disolución de Mn:ZnS QDs.*

Puesto que cabe la posibilidad de que no todos los núcleos de ZnS se dopasen correctamente, se realizó el estudio de fluorescencia que aparece en la **Figura 10**. Dado que la emisión típica del núcleo de ZnS tiene lugar a 420 nm, se concluye que el dopaje ha sido óptimo, no obteniéndose emisión fluorescente significativa en esa zona del espectro.



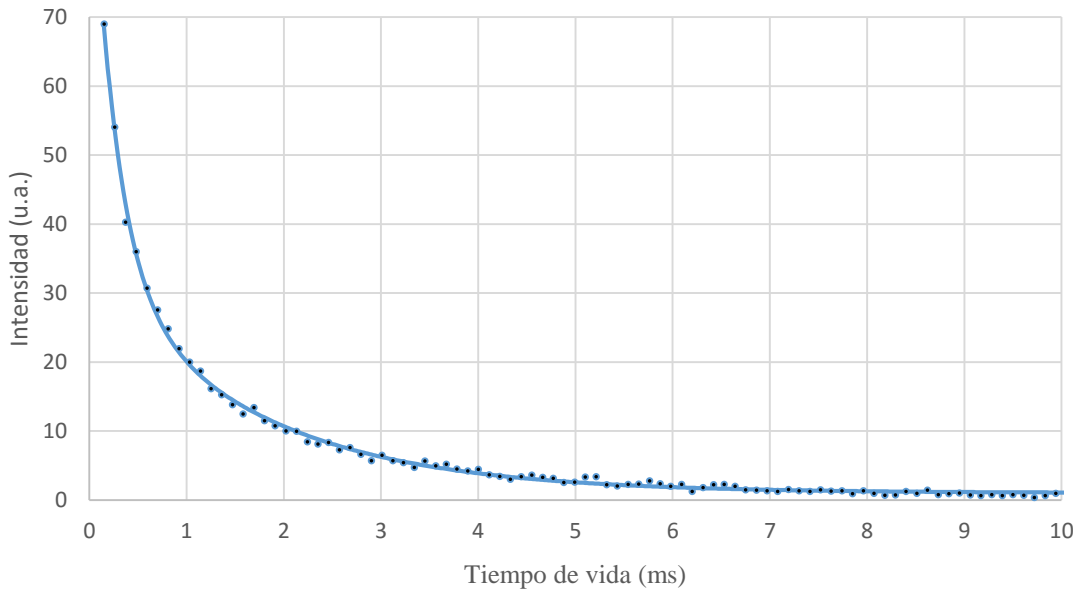
*Figura 10. Espectros de excitación y emisión fluorescente de una disolución de Mn:ZnS QDs.*

Por último, se realizaron medidas del tiempo de vida media de la emisión fosforescente de los QDs sintetizados. El mejor ajuste de la curva de desactivación (**Figura 11**) coincide con el ajuste de tipo doble exponencial (*Ecuación 1*), con dos componentes: desactivación rápida  $\tau_1$ , y desactivación lenta  $\tau_2$ .

$$I = A_1 \cdot e^{(-t/\tau_1)} + A_2 \cdot e^{(-t/\tau_2)} + C \quad \text{Ecuación 1}$$

donde  $I$  es la desactivación,  $A_1$  y  $A_2$  son las fracciones relativas a la intensidad que decae con las constantes de tiempo  $\tau_1$  y  $\tau_2$ ,  $t$  es el tiempo de decaimiento, y  $C$  es la intensidad restante.

En ambos casos, las vidas medias son del orden de milisegundos ( $\tau_1 = 0.250 \pm 0$  ms,  $\tau_2 = 1.642 \pm 0.1$  ms), típico de emisión fosforescente.



**Figura 11.** Curva de desactivación de la emisión fosforescente de una disolución de Mn:ZnS QDs.

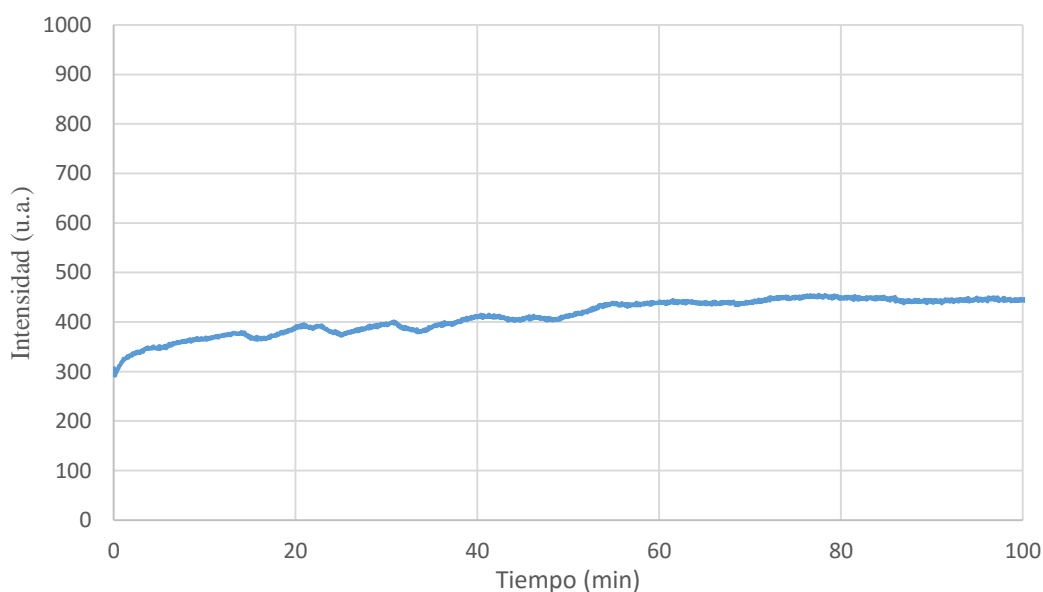
### C.3.2.1. Efecto de la fotoactivación

La fotoactivación es un fenómeno mediante el cual se provoca cambios en la superficie de los QDs que originan un incremento de la luminiscencia de los mismos. Este comportamiento fluorescente de las nanopartículas viene inducido al someterlas a luz

natural o irradiación continua con luz UV. La fotoactivación depende en su mayoría del tipo de modificación superficial a la que han sido sometida las nanopartículas a lo largo de su síntesis. Por ejemplo, en QDs de CdSe/ZnS modificados superficialmente por el método de intercambio de ligandos requieren tiempos de irradiación más largos para obtener una intensa y estable señal luminiscente. Por el contrario, QDs con recubrimientos poliméricos experimentan un incremento importante en la emisión fluorescente en los primeros momentos de la fotoactivación, seguido de una marcada degradación del núcleo y, por lo tanto, decaimiento de la emisión en el último tramo. Esto es debido a que algunos polímeros podrían polimerizar parcialmente bajo luz UV, como consecuencia de reacciones de entrecruzamiento (18).

Se estudió el posible efecto de fotoactivación de los QDs sintetizados, iluminándolos de forma continua a la longitud de onda de excitación que se estableció en el apartado “C.3.2. Características fotoluminiscentes” ( $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$ ). Así se registró también de forma continua la emisión fosforescente de los QDs para estudiar su estabilidad.

Como se observa en la **Figura 12**, la intensidad de emisión de los QDs de ZnS dopados con  $\text{Mn}^{2+}$  apenas se ve afectada tras casi dos horas de exposición continua a la radiación VIS-UV. Este hecho puede deberse a su eficiente proceso de síntesis, puesto que, en el proceso de envejecimiento a temperatura elevada, se mejora la cristalinidad, evitando de este modo defectos superficiales.



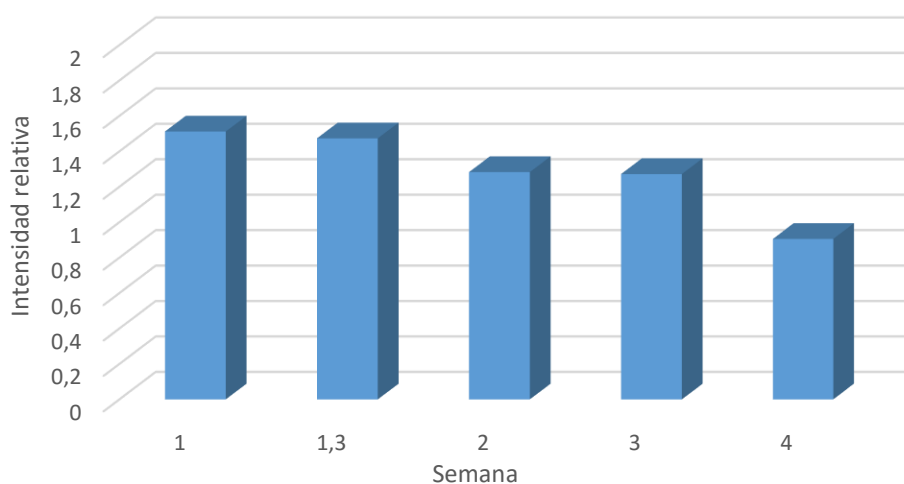
**Figura 12.** Estudio de la fotoestabilidad de los Mn:ZnS QDs.

Se concluye entonces que la emisión de los QDs sintetizados no se vio afectada significativamente por la fotoactivación. La emisión fosforescente es estable y resistente (pueden estar expuestos a ciclos de excitación y fosforescencia durante varias horas sin perder su eficiencia), por lo que pueden ser utilizados para la detección directa del analito de interés sin que se degrade fotoquímicamente.

#### *C.3.2.2. Estabilidad a largo plazo*

Para evaluar la estabilidad coloidal de los QDs dopados con  $\text{Mn}^{2+}$ , se prepararon disoluciones acuosas de los mismos en buffer PBS pH 7.4. Se tomaron alícuotas cada cierto período de tiempo y se midió su emisión fosforescente. Como el equipo puede proporcionar variaciones de la señal que pueden repercutir en dicho estudio, se utilizó como patrón una disolución de rodamina B.

Como se observa en la **Figura 13**, la emisión fosforescente no se ve alterada significativamente con el tiempo, incluso después de 4 semanas almacenado a temperatura y luz ambiental siguen proporcionando una intensa señal luminiscente. Esta estabilidad puede ser debida al proceso de envejecimiento al que se sometieron los QDs durante la síntesis, para incrementar la cristalinidad de la L-cisteína y disminuir los defectos superficiales, lo que hace más estable el recubrimiento, dificultándose de este modo la desorción de los ligandos.



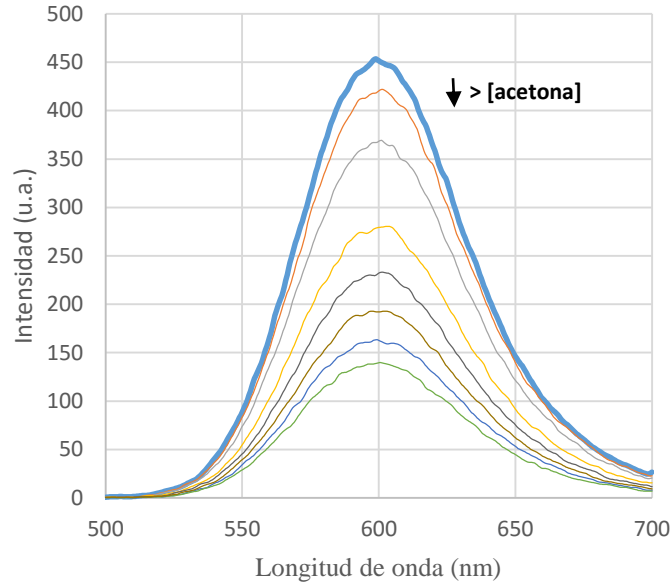
*Figura 13. Evaluación de la estabilidad de Mn:ZnS QDs a largo plazo.*

### *C.3.2.3. Efecto de acetona disuelta*

Se conoce que las propiedades luminiscentes de las nanopartículas dependen de los átomos de la superficie de las mismas y del ambiente en el que se encuentran. Se ha demostrado que la presencia de vapores orgánicos, cationes metálicos y aniones inorgánicos modifican la emisión fosforescente de los QDs. El mecanismo por el que esto se produce, depende de la especie reactiva (interacciones electroestáticas con los ligandos de la superficie del QD, transferencia electrónica desde la banda conductiva del QD a un orbital molecular vacío del analito, o adsorción a la superficie de las nanopartículas semiconductoras) (3).

En este sentido, se procedió al estudio de la sensibilidad óptica de los QDs a la acetona, tomándose como indicativo la detección de fosforescencia. La presencia de L-cisteína en la superficie de los QDs hizo posible su solubilización en buffer PBS pH 7.4.

Mediante sucesivas medidas espectroscópicas realizadas directamente sobre una disolución de QDs en una celda de cuarzo convencional, se fue obteniendo la respuesta de fosforescencia de los Mn:ZnS QDs a adiciones crecientes de acetona, con diferentes concentraciones finales en la celda, que variaron de  $1.3 \text{ gL}^{-1}$  a  $15.5 \text{ gL}^{-1}$ . Los grupos funcionales terminales de la L-cisteína son los que hicieron posible la interacción con la acetona presente en el medio con la superficie del nanocrystal. Como se observa en la **Figura 14**, dicha interacción es la que afecta a la luminiscencia de los QDs, la adición de acetona actúa “quencheando” (apagando) la emisión fosforescente de las nanopartículas de la solución coloidal. Este “quenching” se atribuye a la formación de un anillo de oxazolidona, y posterior formación de una imina que actúa como un eficiente aceptor de electrones. Como consecuencia, el proceso de transferencia de electrones desde los QDs a la imina, produce un decaimiento de la señal fosforescente (13).



**Figura 14.** Efecto de la adición de acetona (de 1.3 gL<sup>-1</sup> a 15.5 gL<sup>-1</sup>) en la emisión fosforescente de Mn:ZnS QDs.

La dependencia de la intensidad de la señal de fosforescencia medida a mayores concentraciones de acetona en celda fue ajustada a la ecuación de Stern-Volmer (Ecuación 2).

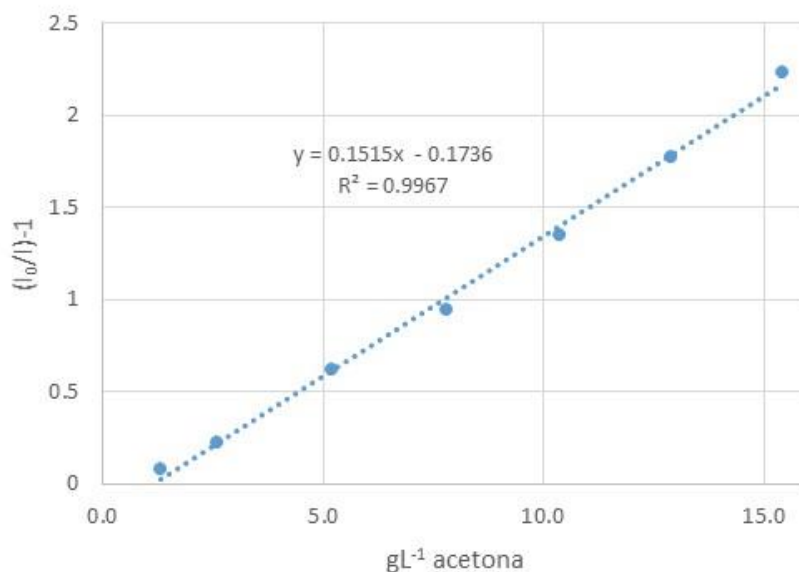
$$(I_o/I) = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

*Ecuación 2*

Donde  $I_o$  es la intensidad de fosforescencia en ausencia de desactivante,  $I$  la intensidad de fosforescencia en presencia de desactivante,  $k_q$  es la constante de “quenching”,  $\tau_0$  es el tiempo de vida del estado excitado y  $[Q]$  es la concentración de desactivante.

Para ello, se representó  $(I_o/I)-1$  frente a la concentración de acetona presente en gL<sup>-1</sup> (**Figura 15**), donde  $I_o$  es la emisión fosforescente de los Mn:ZnS QDs en ausencia de acetona, e  $I$  es la emisión fosforescente de los Mn:ZnS QDs en presencia de concentraciones crecientes de acetona en celda. La representación de Stern-Volmer da lugar a una línea recta hasta una concentración de al menos 15.5 gL<sup>-1</sup> de acetona, que fue la máxima concentración de analito utilizada.





*Figura 15. Representación de Stern-Volmer para el efecto de la adición de acetona (de 1.3 gL<sup>-1</sup> a 15.5 gL<sup>-1</sup>) en la emisión fosforescente de Mn:ZnS QDs.*

## C.4. DESARROLLO DE UN SENSOR LUMINISCENTE PARA LA DETECCIÓN DE ACETONA EN ATMÓSFERAS CONTAMINADAS

Una vez realizada la síntesis, solubilización y caracterización de los Mn:ZnS QDs, se procedió a la inmovilización de los mismos en una matriz inorgánica de tipo sol-gel. Destacar que el resto de la experimentación se desarrolló en atmósfera inerte de argón, no como el desarrollo del apartado precedente “C.3. CARACTERIZACIÓN”, cuyo medio fue constituido por buffer PBS.

### C.4.1. Procedimiento de síntesis de una matriz sol-gel para la inmovilización de Mn:ZnS QDs

Las fases sensoras fosforescentes para la determinación de acetona fueron sintetizadas mediante atrapamiento de los QDs en una matriz sol-gel durante el proceso de polimerización como se detalla en E. Sotelo-González y col. (13), para lo que se tuvo en cuenta los posibles problemas de lixiviación que las nanopartículas pudieran presentar. Ante este hecho, se procedió a la preparación de distintos sol-geles dopados con los QDs utilizando diferentes ratios de 17:83 a 83:17 (v/v) de APTES y TMOS como precursor de sílice, puesto que se esperaba que la L-cisteína de las nanopartículas se uniera covalentemente al grupo amino del precursor, confiriéndole estabilidad al sistema final.

Se añadieron también a la mezcla etanol y agua como solventes; EDC (100:1 con respecto a la cantidad de QDs) para retener las partículas, unidas covalentemente a la matriz; y NaOH como catalizador del proceso de polimerización.

Los reactivos fueron añadidos bajo condiciones continuas de agitación en el siguiente orden (se muestra como ejemplo el ratio 50:50 APTES:TMOS):

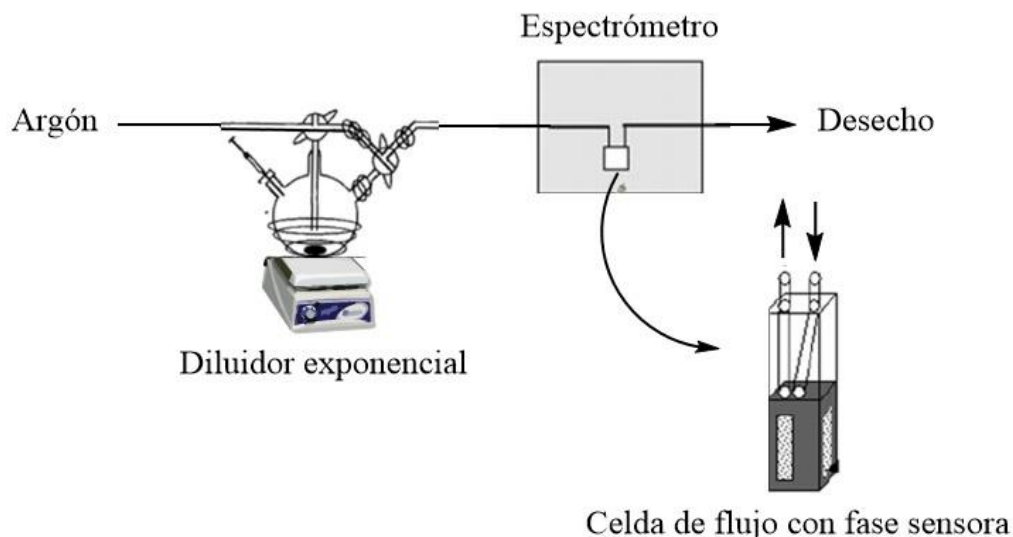
- 1) 2.5 mL de etanol
- 2) 1 mL de Mn:ZnS QDs ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) en PBS
- 3) 750  $\mu\text{L}$  de APTES
- 4) 100  $\mu\text{L}$  de EDC
- 5) 750  $\mu\text{L}$  de TMOS
- 6) 50  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1 M

Una vez se homogeneizan todos los componentes, tiene lugar el proceso de polimerización. Se dejó secar cada uno de los sol-gel en estufa a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 semana, hasta que el peso fuese constante.

#### **C.4.2. Caracterización de Mn:ZnS QDs inmovilizados en matrices sol-gel**

El xerogel obtenido se sometió a un proceso de triturado en un mortero ágata y, pasando por una serie de tamices, se separaron 3 fracciones diferentes: 200, 80 y  $63 \mu\text{m}$ .

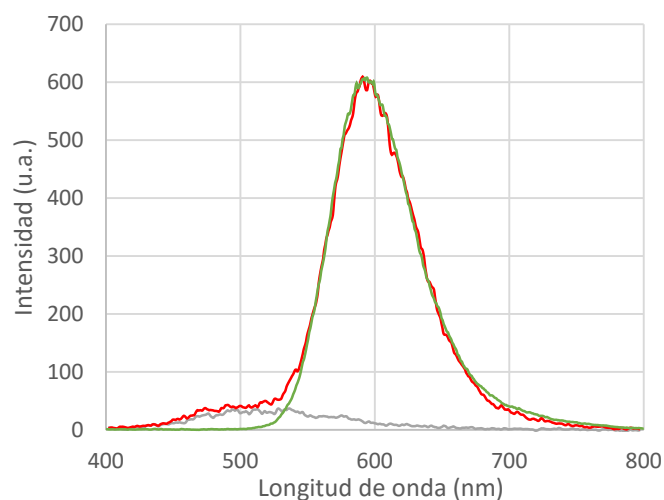
Cada fracción fue empaquetada en una celda de flujo sometida al flujo continuo de gas argón con ayuda de un diluidor exponencial con llave de tres vías (**Figura 16**). El diluidor hizo posible que el gas de arrastre llegase a la celda de flujo y, por lo tanto, al sensor, o, por el contrario, permitiría desviar el flujo de gas para que circulase por el interior del matraz y así arrastrase las muestras que en él se depositaron hasta la fase sensora. El flujo del gas portador se controló y mantuvo constante durante todo el proceso por medio de un rotámetro.



*Figura 16. Montaje experimental utilizado para todas las mediciones.*

Las condiciones instrumentales de fosforescencia que resultaron óptimas fueron determinadas por un  $t_d$  de 0.1 ms, un  $t_g$  de 2 ms y una longitud de onda de excitación de 290 nm.

Como se muestra en la **Figura 17**, el espectro de emisión para los Mn:ZnS QDs antes de ser inmovilizados coincide con el que se obtuvo después de ser inmovilizados en la matriz. No se observa desplazamiento del espectro ni variación en la luminiscencia. Por lo tanto, las nanopartículas retienen sus propiedades luminiscentes incluso después de ser inmovilizadas.



*Figura 17. Comparación del espectro de emisión de Mn:ZnS QDs en disolución (línea verde) e incorporados a matriz sol-gel (línea roja).*

Tras la caracterización de todos los sol-geles, se comprobó que ninguna de las fracciones demostraba problemas de sobre presión en la celda. Además, las fracciones de 200  $\mu\text{m}$  aportaban señales de fotoluminiscencia más intensas, seguidas de las de 80 y 65  $\mu\text{m}$ . Fueron por lo tanto las fracciones de 200  $\mu\text{m}$  las escogidas para determinar la composición de gel óptima.

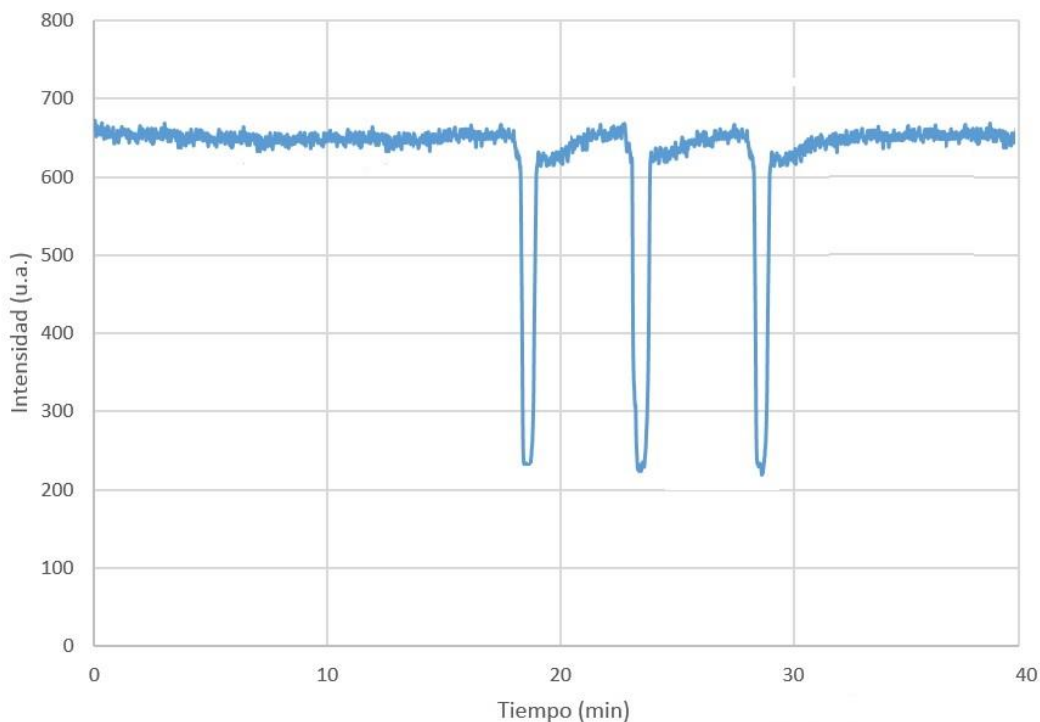
La mejor estabilidad de señal luminiscente se obtuvo para los geles con una relación 50:50 (v/v) APTES:TMOS, por lo que fue este ratio el escogido para el estudio del comportamiento de las nanopartículas inmovilizadas en matrices sol-gel ante la presencia de acetona en flujo de gas argón.

### C.4.3. Efecto de acetona

Como se demostró en el apartado “C.3.2.3. *Efecto de acetona disuelta*”, la emisión fosforescente de los Mn:ZnS QDs se ve afectada por la presencia de acetona en el medio, un grupo electrofílico que actúa como “quencher” de la emisión. Se espera, por lo tanto, que tenga el mismo efecto sobre los QDs inmovilizados en los sol-geles.

Con el objetivo de demostrar dicho “quenching”, se inyectaron diversas concentraciones de acetona directamente en el flujo de gas argón por medio del diluidor exponencial, el cual se calentó hasta conseguir la evaporación total del analito, poniéndolo de este modo en contacto con la fase sensora y recogiendo el comportamiento luminiscente en el espectrómetro. Se asegura así un control del nivel de acetona en la corriente de gas portador.

Como se muestra en la **Figura 18**, la presencia de acetona actúa como “quencher”, disminuyendo la emisión fosforescente de los QDs de manera notoria. Se observa también que la recuperación del xerogel tiene lugar en cuestión de pocos minutos, por la reversibilidad del proceso, y que existe una alta reproducibilidad entre inyecciones de igual concentración de acetona.



**Figura 18.** Respuesta fosforescente de la fase sensora ante inyecciones de igual concentración de acetona ( $0.788 \text{ gL}^{-1}$ ).

Al trabajar empleando un diluidor exponencial, se encontró una relación exponencial entre la concentración de analito y el tiempo que transcurre entre el comienzo de la disminución de emisión de fosforescencia de los Mn:ZnS QDs y la recuperación de la fosforescencia basal (*Ecuación 3*).

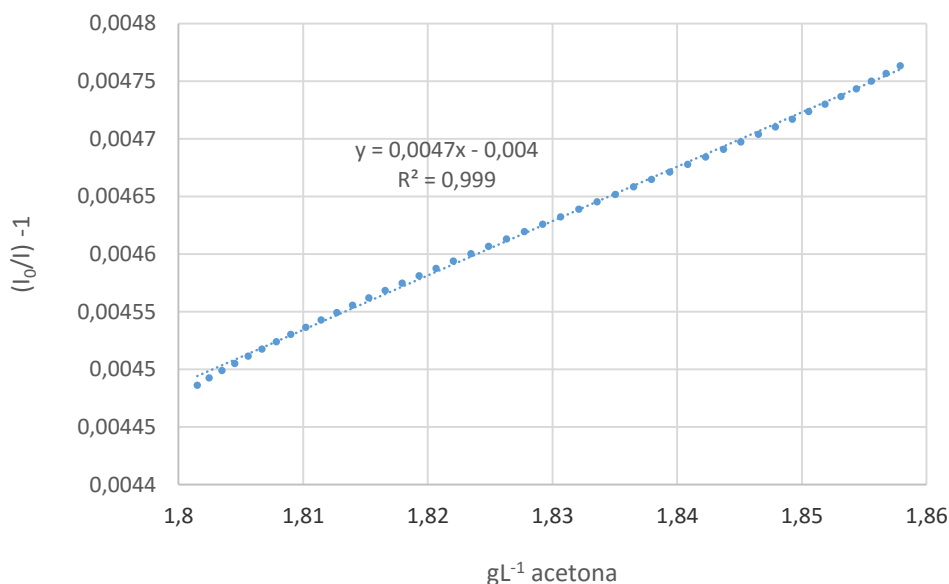
$$C = C_o \cdot e^{-(F/V_o)t}$$

*Ecuación 3*

donde  $C$  es la concentración de analito en contacto con el xerogel,  $C_o$  es la concentración de analito inyectada,  $F$  es el flujo de gas de arrastre,  $V_o$  es el volumen del matraz y  $t$  es el tiempo a cada instante.

La estimación de la concentración de acetona en cada instante de la inhibición, permitió deducir la dependencia de la intensidad de la señal de fosforescencia a mayores concentraciones de acetona en celda, ajustada a la ecuación de Stern-Volmer (*Ecuación 2*). Se representó  $(I_o/I)-1$  frente a la concentración de acetona presente en  $\text{gL}^{-1}$ , donde  $I_o$  es la emisión fosforescente de los Mn:ZnS QDs en ausencia de acetona, e  $I$  es la emisión

fosforescente de los Mn:ZnS QDs en presencia del flujo de analito. La representación de Stern-Volmer dio lugar a una línea recta con un coeficiente de regresión lineal ( $R^2$ ) de 0.9990 (**Figura 19**).



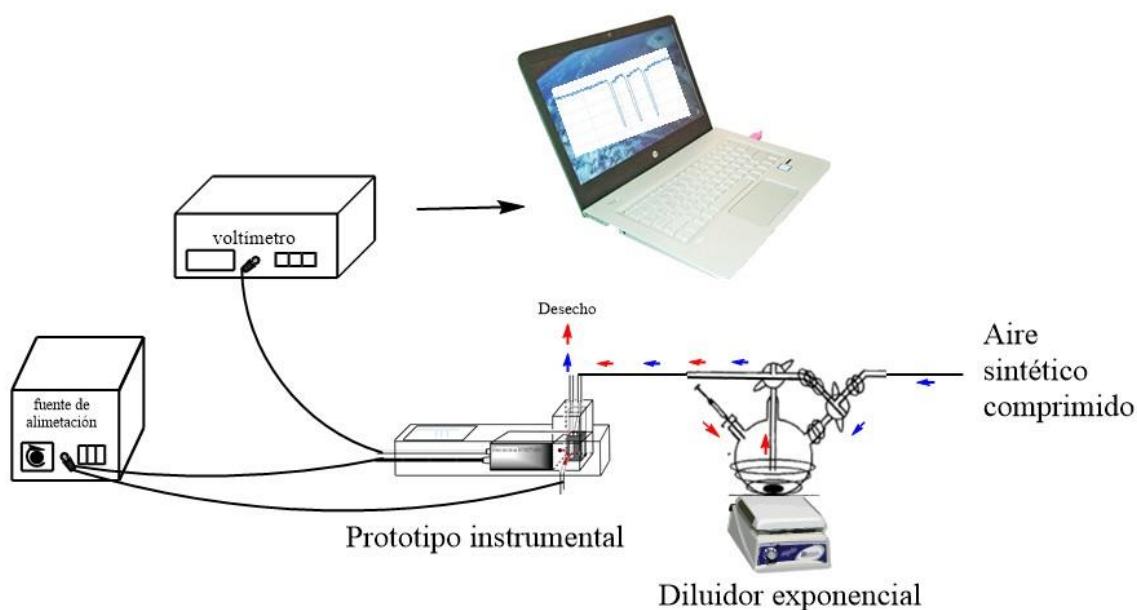
**Figura 19.** Representación de Stern-Volmer para el efecto de la adición de 0.788 gL<sup>-1</sup> de acetona en la emisión fosforescente de Mn:ZnS QDs.

La cinética de recuperación de la fotoluminiscencia del xerogel fue relativamente rápida para todas las concentraciones estudiadas, 1-3 minutos en las concentraciones más bajas y alrededor de 10 minutos para concentraciones mayores del 1.6 gL<sup>-1</sup> de acetona. Además, se comprobó la reproducibilidad de las señales obtenidas a través de los sol-geles mediante sucesivas inyecciones de la misma concentración de acetona (en este caso 0.788 gL<sup>-1</sup>), obteniéndose un coeficiente de variación de 3.4 %, considerándose un método apto aquel con valores menores de 5 %. El límite de detección, que ha sido calculado como la concentración de analito que da lugar a una señal igual a tres veces la desviación estándar del blanco, ha resultado ser de 1.4 · 10<sup>-4</sup> mg L<sup>-1</sup>. Se trata de un límite muy por debajo del que establece el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT) para 8 horas de trabajo (1.21 mg L<sup>-1</sup>) (1).

## C.5. IMPLEMENTACIÓN DEL SENSOR EN UN PROTOTIPO INSTRUMENTAL

### C.5.1. Diseño del prototipo instrumental

Una vez sintetizados los xerogeles y probada su actividad sensora ante diferentes concentraciones del analito de interés, en este caso acetona, se procedió a su implementación en un prototipo instrumental desarrollado por el Área de Tecnología Electrónica de la Universidad de Oviedo. Con el objetivo de desarrollar un prototipo de sistema instrumental basado en nanopartículas capaz de detectar especies volátiles tóxicas en ambientes de trabajo, este Área, en colaboración con el Grupo de Espectrometría Analítica del Departamento de Química Física y Analítica, ha participado en un proyecto (Proof of Concept), financiado por el IDEPA (Instituto de Desarrollo Económico del Principado de Asturias) y Arcelor Mittal. La **Figura 20** muestra una imagen del sistema instrumental desarrollado.



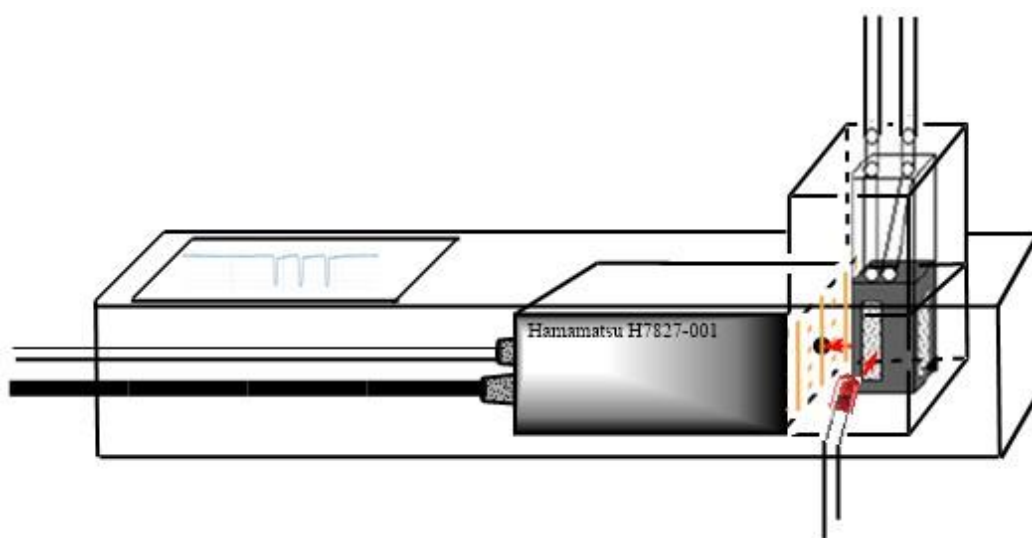
*Figura 20. Disposición de prototipo instrumental dentro del banco de ensayos.*

Como se puede ver, el montaje experimental utilizado es muy semejante al llevado a cabo en el apartado “C.4.2. Caracterización de Mn:ZnS QDs inmovilizados en matrices sol-gel”, siendo sustituido en su caso el espectrómetro por el dispositivo diseñado, y utilizándose aire sintético comprimido para generar el flujo de gas de arrastre del

elemento en estudio. Esta modificación de argón por aire sintético comprimido no afectó al desarrollo del experimento ni a los resultados obtenidos en el mismo.

La muestra, al igual que en las caracterizaciones realizadas anteriormente, se encontraba localizada dentro de una celda de flujo, cuya posición se establece dentro del instrumento. La salida del instrumento es registrada en un ordenador utilizando el software LabVIEW de National Instruments. LabVIEW es un software especialmente adecuado para la adquisición, tratamiento y visualización de señales, además de otras utilidades como el control automático de instrumentos.

La **Figura 21** muestra la localización de la muestra dentro de la celda de flujo. Tanto la fuente de luz como el detector de luz se seleccionan a la vista de los espectros de excitación y de emisión del sensor químico. Así, para la fuente de luz se ha escogido un diodo LED UV cuyo pico de emisión es de 260 nm. El detector de luz ha de cumplir con el espectro de emisión del sensor.



*Figura 21. Esquema de prototipo instrumental.*

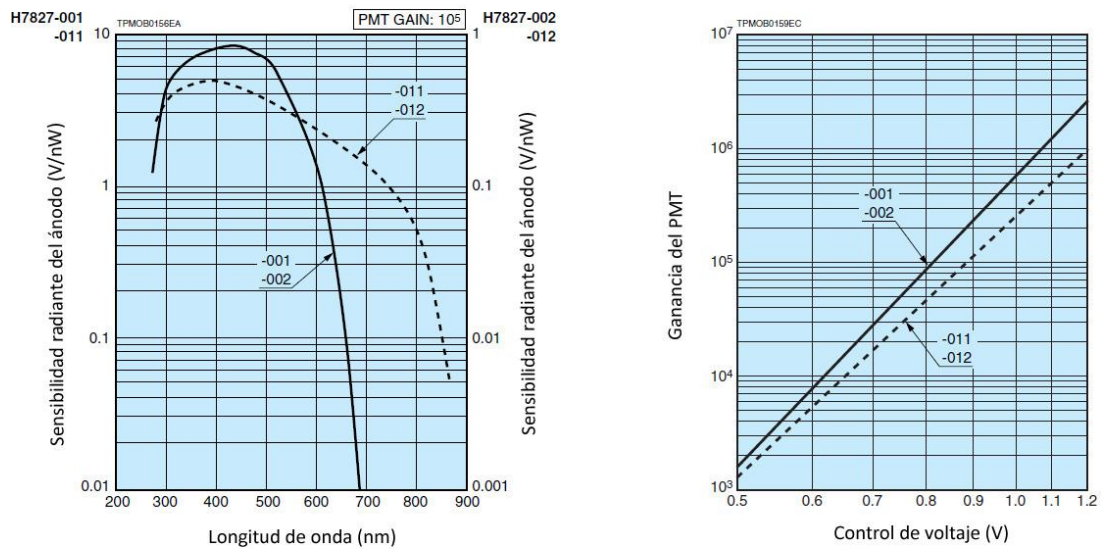
Para el detector, como se estimó que los niveles de luz iban a ser muy bajos, se utilizó un fotomultiplicador (PMT), por tener una buena relación señal-ruido (SNR) y permitir obtener una gran ganancia. Un PMT es una válvula de vacío que, por efecto fotoeléctrico, genera multitud de electrones a partir de un fotón emitido por los QDs. El resultado final



es la ganancia general de un millón de electrones, produciéndose de este modo una corriente medible a partir de un flujo muy pequeño de fotones incidentes (19). El PMT utilizado fue un Hamamatsu H7827-001.

El PMT, por lo tanto, genera una corriente, proporcional a la intensidad de la luz incidente. Esta corriente eléctrica suele ser convertida en tensión por ser más cómodo su procesamiento posterior.

Las principales características a considerar en la elección de un PMT son su respuesta espectral, la ganancia, la corriente de oscuridad y el tiempo de respuesta (**Figura 22**).



**Figura 22.** Características del PMT H7827-001, sensibilidad del ánodo (izquierda) y ganancia del PMT (derecha).

La respuesta espectral es la relación existente entre la sensibilidad del fotocátodo y la longitud de onda incidente, en el caso en cuestión, a 590 nm se obtiene una buena sensibilidad con el PMT escogido. La ganancia es la relación entre la corriente de ánodo y la corriente que parte del fotocátodo, el control de voltaje en este aspecto fue establecido entre 0.7 y 0.8 V. La corriente de oscuridad es la corriente del ánodo cuando el fotomultiplicador opera en oscuridad. Por último, el tiempo de respuesta viene dado por el tiempo de transición desde que el fotocátodo se ilumina con un pulso de luz hasta que la corriente de ánodo alcanza el valor de pico (entre 1 y 10 ns) y por el tiempo de subida que transcurre desde que la corriente de ánodo alcanza el 10% del valor de pico hasta que

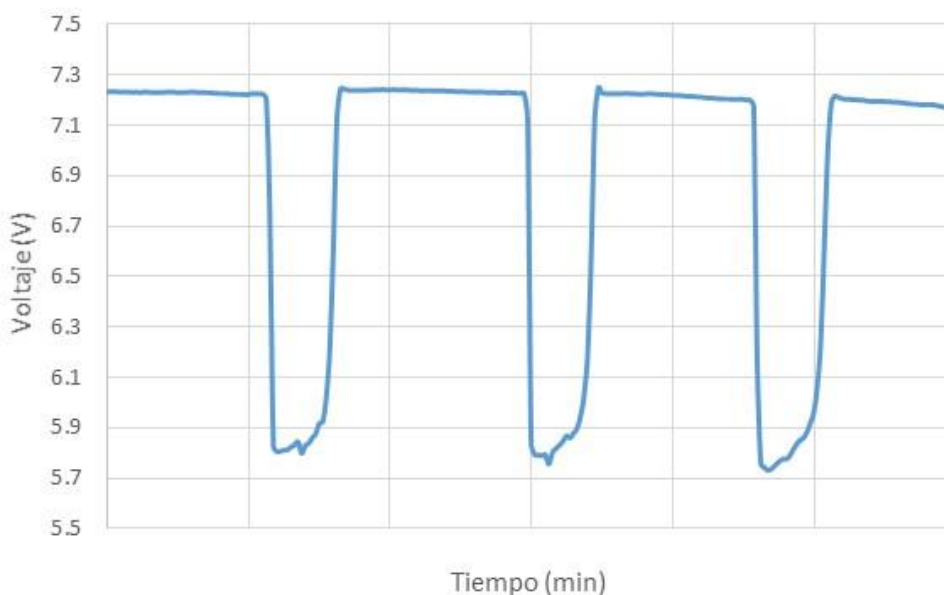
alcanza el 90% cuando el fotocátodo se ilumina con un pulso de luz (entre 20 y 70 ns) (20).

Pudiera ocurrir que, debido a que el espectro del PMT va más allá del necesario para cubrir el espectro de emisión del sensor, se captase otro tipo de radiación óptica que no proceda del sensor. Para evitarlo, se colocó un filtro óptico entre el sensor y el detector, con una banda de paso estrecha.

### C.5.2. Detección de acetona

Se inyectaron diversas concentraciones de acetona directamente en el flujo de aire sintético comprimido por medio del diluidor exponencial, recogiendo el comportamiento luminiscente con ayuda del prototipo instrumental diseñado.

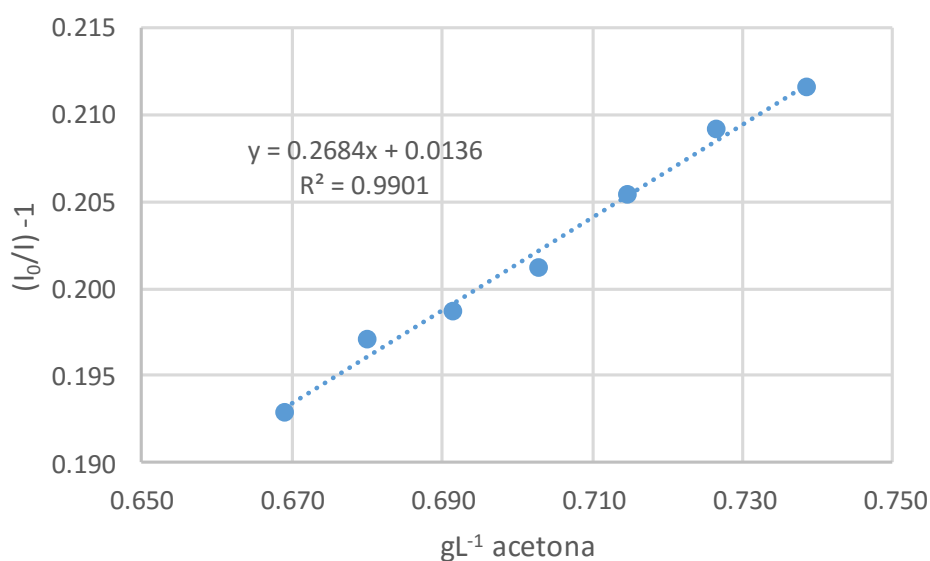
Como se muestra en la **Figura 23**, la presencia de acetona actúa como se esperaba, disminuyendo la emisión fosforescente de los Mn:ZnS QDs inmovilizados en la matriz sol-gel. Se observa que la cinética de recuperación del xerogel tiene lugar en cuestión de pocos minutos como se demostró anteriormente. El sistema es suficientemente sensible como para detectar el “quenching” y la reversibilidad del proceso.



*Figura 23. Respuesta fosforescente de la fase sensora ante inyecciones de igual concentración de acetona ( $0.946 \text{ gL}^{-1}$ ).*

Se puede apreciar también la alta reproducibilidad que posee el sistema ante inyecciones de igual concentración de acetona (en este caso  $0.946 \text{ gL}^{-1}$ ), con un coeficiente de variación de 1.5 %, considerándose un método apto aquel con valores menores de 5 %.

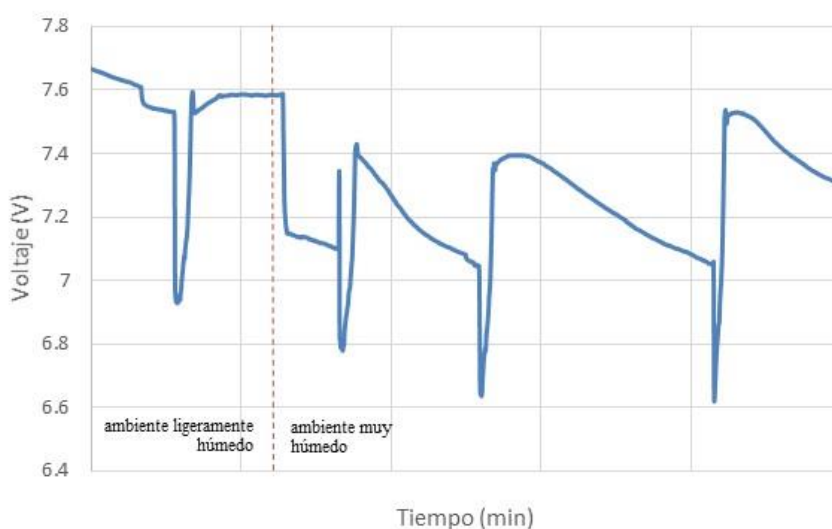
La estimación de la concentración de acetona en cada instante de la inhibición mediante la *Ecuación 3*, permitió deducir la dependencia de la intensidad de la señal de fosforescencia a mayores concentraciones de acetona en celda, ajustada a la ecuación de Stern-Volmer (*Ecuación 2*). Se representó  $(I_0/I)-1$  frente a la concentración de acetona presente en  $\text{gL}^{-1}$ , donde  $I_0$  es la emisión fosforescente de los Mn:ZnS QDs en ausencia de acetona, e  $I$  es la emisión fosforescente de los Mn:ZnS QDs en presencia del flujo de analito. La representación de Stern-Volmer dio lugar a una línea recta con un coeficiente de regresión lineal del orden de 0.9901 (**Figura 24**).



**Figura 24.** Representación de Stern-Volmer para el efecto de la adición de  $0.946 \text{ gL}^{-1}$  de acetona en la emisión fosforescente de Mn:ZnS QDs.

El límite de detección, que ha sido calculado como la concentración de analito que da lugar a una señal igual a tres veces la desviación estándar del blanco, ha resultado ser de  $9 \text{ mg L}^{-1}$ , algo por encima del que establece el INSHT para la acetona ( $1.21 \text{ mg L}^{-1}$ ), totalmente comprensible al tratarse de un prototipo instrumental por optimizar.

Toda la experimentación desarrollada hasta el momento ha transcurrido en un ambiente totalmente seco donde tan solo un flujo de gas inerte invadía el espacio del xerogel. Pero las condiciones de medida que se puedan presentar en situaciones reales pueden interferir en las mediciones del sensor. Para comprobar si el factor humedad realmente interfiere en la detección de acetona por el prototipo, se realizaron mediciones de la fluctuación de la emisión fosforescente por parte de los Mn:ZnS QDs en presencia de un ambiente ligeramente húmedo y muy húmedo (**Figura 25**).



**Figura 25.** Respuesta fosforescente de la fase sensora ante inyecciones de igual concentración de acetona ( $1.261 \text{ gL}^{-1}$ ) en ambiente ligeramente húmedo y ambiente muy húmedo.

Se comprobó que, en un ambiente ligeramente húmedo, se obtiene una señal similar a la detectada en condiciones de total ausencia de humedad, el xerogel continúa respondiendo de la manera esperada ante la presencia de acetona. Se observan además cambios muy bruscos al introducir repentinamente una atmósfera muy húmeda, pero a muy corto plazo la señal termina estabilizándose en ese entorno, respondiendo siempre con un claro “quenching” por parte de la acetona sobre las nanopartículas.

Por último, y en base a estas últimas comprobaciones, se dedujo la dependencia de la intensidad de la señal de fosforescencia a concentraciones de acetona en celda de  $1.261 \text{ gL}^{-1}$ , ajustada a la ecuación de Stern-Volmer (*Ecuación 2*), para cada una de las atmósferas, cuyas  $R^2$  y límite de detección se comparan en la **Tabla 1**.

*Tabla 1. Comparación de condiciones de medida experimentales.*

	<b>ambiente ligeramente húmedo</b>	<b>ambiente muy húmedo</b>
$R^2$	0.991	0.985
Límite de detección ( $\text{mgL}^{-1}$ )	3	17

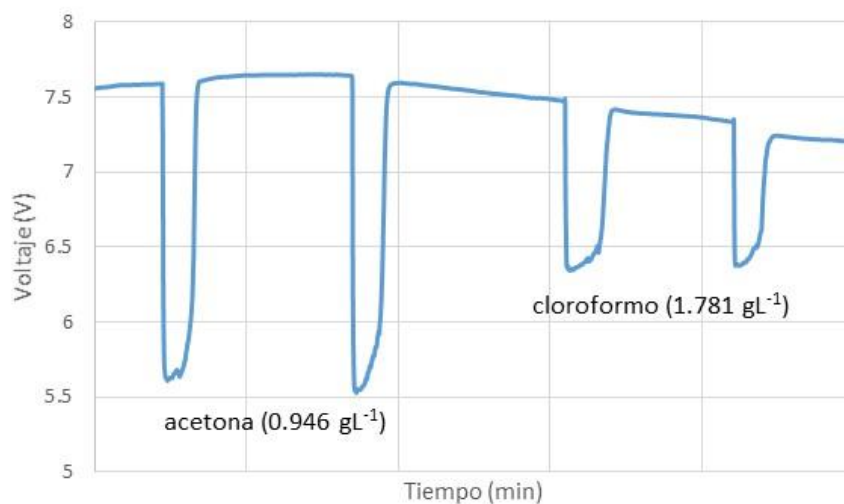
Se obtiene un balance positivo en cuanto a que el sensor diseñado es capaz de medir tanto en atmósfera seca como húmeda, mostrando una clara linealidad en la dependencia de la fosforescencia ante la presencia de acetona ( $R^2$  de 0.991 y 0.985 para ambiente ligeramente húmedo y muy húmedo respectivamente) y límites de detección interesantes a pesar de que el dispositivo está en desarrollo.

### **C.5.3. Detección de otro tipo de especies tóxicas: cloroformo**

Hasta ahora se ha podido comprobar el buen funcionamiento del prototipo instrumental en desarrollo ante la exposición de acetona, tanto en atmósfera seca como húmeda. Sin embargo, se pretendió evaluar también la exposición a otro tipo de agentes tóxicos en ambientes ocupacionales, como puede ser el cloroformo.

La exposición a cloroformo puede darse al respirar aire contaminado o beber agua contaminada, e incluso durante la manipulación de sustancias que lo contienen. Los síntomas propios de una inhalación de cloroformo son mareos, fatiga, y dolores de cabeza. Exposiciones prolongadas o repetidas al cloroformo, ya sea respirado o ingerido, puede causar daños en hígado, pulmones y riñones, llegando a ser cancerígeno. Hoy en día se puede encontrar en la manufacturación de otros productos químicos, o en pequeñas cantidades formadas como consecuencia de la adición de cloro al agua, como es el caso de las piscinas (21).

Con el objetivo de comprobar que el sensor también es adecuado para detectar otro tipo de tóxicos ambientales como el cloroformo, se realizaron diversas exposiciones del mismo a inyecciones de 600  $\mu\text{L}$  de acetona y cloroformo (**Figura 26**).



**Figura 26.** Respuesta fosforescente de la fase sensora ante inyecciones de igual volumen inicial de acetona y cloroformo (600  $\mu$ L).

A pesar de que la concentración de cloroformo en celda es mayor que la de acetona, es la acetona la que muestra mayor inhibición de la fosforescencia de los Mn:ZnS QDs. El cloroformo, por su estructura, muestra una menor formación del anillo de oxazolidona, y posterior formación de una imina donadora de electrones (“C.3.2.3. Efecto de acetona disuelta”). Aun así, la señal obtenida es de buena calidad, permitiendo determinar una recta de calibrado con una  $R^2$  de 0.9467 y un límite de detección de 98 mg L<sup>-1</sup>.

## ***D. CONCLUSIONES***

Las principales conclusiones derivadas de los estudios y resultados experimentales del presente Trabajo de Fin de Máster se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Se ha llevado a cabo la síntesis de QDs fosforescentes gracias a la incorporación de  $\text{Mn}^{2+}$  en la estructura de QDs de núcleo ZnS, facilitándose de este modo la transición prohibida del  $\text{Mn}^{2+} \text{ } ^4\text{T}_1\text{-}^6\text{A}_1$ , lo que incrementa la luminiscencia ampliando el intervalo útil de propiedades espectroscópicas. Además, el desarrollo de su síntesis junto con L-cisteína da solubilidad y estabilidad en medios acuosos, aportando, así mismo, carga negativa. Esa carga negativa genera repulsión electrostática entre los nanocristales, evitando así su agregación en medios acuosos.
- Se han podido caracterizar las nanopartículas sintetizadas en función de su tamaño y forma gracias a la técnica de TEM, donde se comprobó que se trataban de nanocristales monodispersos de forma circular con tamaños en torno 3-4 nm, confirmándose con el DLS. Con el mismo fin de caracterización, se llevaron a cabo estudios de fotoluminiscencia, obteniendo una intensa banda de emisión fosforescente en torno a 590 nm, de nuevo correspondiente a la transición prohibida del  $\text{Mn}^{2+}$ . La vida media es del orden de los milisegundos, propia de la emisión fosforescente. Por último, la fotoactivación modificó ligeramente la superficie de los Mn:ZnS QDs incrementándose muy ligeramente su luminiscencia, aunque la intensidad apenas se ve afectada, por lo que se concluye que el proceso de síntesis se desarrolló de manera satisfactoria.
- Se realizaron diferentes exposiciones de las nanopartículas sintetizadas a concentraciones crecientes de acetona, comprobándose la dependencia que presenta la emisión fotoluminiscente de los Mn:ZnS QDs hacia esta cetona. La acetona actúa produciendo un “quenching” de la emisión fosforescente de los nanocristales en solución coloidal.
- Se ha llevado a cabo la inmovilización de los Mn:ZnS QDs en una matriz inorgánica sol-gel para el desarrollo y caracterización de una fase sensora luminiscente destinada a la detección de acetona en su estado gaseoso. Tras la preparación de diferentes sol-geles con diferentes ratios de APTES:TMOS, se



determinó que el ratio óptimo para llevar a cabo el estudio es de 50:50. Posteriormente se sometió el xerogel a un proceso de triturado con el objetivo de identificar el tamaño óptimo de gel para trabajar en atmósfera seca. Todos los tamaños obtenidos (200, 80 y 63  $\mu\text{m}$ ) demostraron ser aptos para su empleo en celdas de flujo, sin ofrecer ningún tipo de sobre presión en celda, aunque fue la fracción de 200  $\mu\text{m}$  la que ofreció señales de fotoluminiscencia más intensas.

- Tras la comprobación del buen funcionamiento del xerogel en el espectrómetro ante concentraciones crecientes de acetona en celda, se procedió a la implementación de la fase sensora luminiscente basada en QDs a un prototipo instrumental en desarrollo para la determinación de especies químicas de interés en su estado volátil. Se evaluó el potencial del prototipo instrumental ante distintos tóxicos ambientales y bajo condiciones de trabajo variables. Se establece tras el estudio que se trata de un dispositivo sensor capaz de monitorizar “in situ” y a tiempo real la concentración de especies químicas pertenecientes al campo del control ambiental, aportando alta movilidad por su pequeño tamaño, y bajo coste en comparación con equipos fijos de laboratorio como pueden ser los espectrómetros.

Sin duda estamos ante un prototipo instrumental basado en nanopartículas luminiscentes con mucho potencial. Aunque aún se está trabajando en su desarrollo y optimización, pronto se obtendrá un dispositivo con total independencia que, además, será capaz de aportar resultados inmediatos a través de su pantalla o “display” en desarrollo, e incluso capaz de discernir o identificar diferentes analitos detectados. Todo esto se englobaría dentro de posibles líneas de investigación futuras.

## ***E. BIBLIOGRAFÍA***

1. **Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.** [En línea] [Citado el: 2 de Mayo de 2016.] [http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/Valores\\_Limite/Doc\\_Toxicologica/Ficheros/DLEP05.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/Valores_Limite/Doc_Toxicologica/Ficheros/DLEP05.pdf).
2. *The chemical substances and the neurotoxic effect on workers.* **R. Morales, A. Barahona.** 2, 2013, Enfoque UTE, págs. 45-58.
3. *Mn-doped ZnS quantum dots for the determination of acetone by phosphorescence attenuation.* **E. Sotelo-Gonzalez, M.T. Fernandez-Argüelles, J.M. Costa-Fernandez, A. Sanz-Medel.** 712, 2012, Analytica Chimica Acta, págs. 120-126.
4. *CdSe quantum dots as luminescent probes for spironolactone determination.* **J. Liang, S. Huang, D. Zeng, Z. He, X. Ji, X. Ai, H. Yang.** 69, 2006, Talanta, págs. 126–130.
5. *Multifunctional nanoparticles—properties and prospects for their use in human medicine.* **N. Sanvicens, M.P. Marco.** 26, 2008, Trends in Biotechnology, págs. 425-433.
6. *Core/Shell semiconductor nanocrystals.* **P. Reiss, M. Protière, L. Li.** 2009, Small 5, págs. 154-168.
7. *Optical sensing with Quantum Dots.* **Murphy, C.J.** 74, 2002, Anal. Chem., págs. 520A-526A.
8. *Semiconductor Quantum Dots in Chemical Sensors and Biosensors.* **M.F. Frasco, N. Chaniotakis.** 9, 2009, Sensors, págs. 7266-7286.
9. *A Natural Bridge for Quantum Dot-Antibody Conjugates.* **E. R. Goldman, E. D. Balighian, H. Mattoussi, M. K. Kuno, J. M. Mauro, P. T. Tran.** 124, 2002, J. Am. Chem. Soc., págs. 6378-6382.
10. *Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics.* **X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A.M. Wu, S.S. Gambhir, S. Weiss.** 307, 2005, Science, págs. 583-544.
11. *Nanotechnology applications: a driving force for R&D investment.* **A. Correia, M. Pérez, J. J. Sáenz, P. A. Serena.** 204, 2007, phys. stat. sol., págs. 1611-1622.

12. *Semiconductor quantum dots as fluorescent probes for in vitro and in vivo bio-molecular and cellular imaging.* **S.B. Rizvi, S. Ghaderi, M. Keshtgar, A.M. Seifalian.** 0, 2010, Nano Reviews, Vol. 1, pág. 5161.
13. *Immobilization of phosphorescent quantum dots in a sol-gel matrix sensing.* **E. Sotelo-Gonzalez, A.M. Coto-Garcia, M.T. Fernandez-Argüelles, J.M. Costa-Fernandez, A. Sanz-Medel.** 174, 2012, Sensors and Actuators B, págs. 102-108.
14. *Syntheses and Applications of Mn-Doped II-VI Semiconductor Nanocrystals.* **H. Yang, S. Santra, P.H. Holloway.** 5, 2005, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, págs. 1364-1375.
15. **D.L. Andrews, G.D. Scholes, G.P. Wiederrecht.** *Comprehensive Nanoscience and Technology.* London, Burlington MA, San Diego CA. : Academic Press, 2011. págs. 104-105. Vol. 5, ISBN 978-0-12-374390-9.
16. *Luminescence in colloidal Mn<sup>2+</sup>-doped semiconductor nanocrystals.* **R. Beaulac, P.I. Archer, D.R. Gamelin.** 181, 2008, Journal of Solid State Chemistry, págs. 1582-1589.
17. *Entrapment of quantum dots in sol-gel matrices to develop sensing material based on fluorescence resonance energy transfer.* **A.M. Coto-García, M.T. Fernández-Argüelles, J.M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel.** 2009, Chem. Commun., págs. 5454-5456.
18. *The influence of surface coating on the properties of water-soluble CdSe and CdSe/ZnS quantum dots.* **A.M. Coto-García, M.T. Fernández-Argüelles, J.M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel, M. Valledor, J.C. Campo, F.J. Ferrero.** 15, 2013, J Nanopart Res, pág. 1330.
19. *Large-area avalanche photodiodes challenge PMTs.* **B. Koren, M. Szawlowski.** 1998, Laser Focus World.
20. *Fotomultiplicadores. Más sensibles que cualquier otro sensor.* **J.C. Campo-Rodríguez, M.A. Pérez-García, F.J. Ferrero-Martín, J. Díaz-González.** 259, 1995, Automática e Instrumentación.

21. **Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.** [En línea] [Citado el: 6 de Julio de 2016.] [http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/Valores\\_Limite/Doc\\_Toxicologica/FicherosSerie2/DLEP%2026.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/Valores_Limite/Doc_Toxicologica/FicherosSerie2/DLEP%2026.pdf).

22. *A Novel Photoelectrochemical Biosensor for Tyrosinase and Thrombin Detection.* **J. Chen, Y. Liu, G.C. Zhao.** 16, 2016, *Sensors*, pág. 135.